

Aus dem Institut für Tropenmedizin der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. J. Knobloch

**Evaluierung von PCR-Methoden zur Identifizierung und  
Differenzierung von Erregern der Zygomycose und  
Aspergillose**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Franziska Magdalena Konrad

aus  
Ulm

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. R. Bialek

2. Berichterstatter: Frau Privatdozentin Dr. U. Schumacher

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
1.1	ZYGOMYKOSEN UND ASPERGILLOSEN .....	7
1.2	THERAPIE VON ASPERGILLOSEN UND ZYGOMYKOSEN .....	13
1.3	DIFFERENZIALDIAGNOSTIK VON ASPERGILLOSEN UND ZYGOMYKOSEN .....	14
1.4	ZIELE DER ARBEIT .....	20
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
2.1	REAGENZEN UND GERÄTE .....	20
2.1.1	<i>Enzyme und Chemikalien</i> .....	21
2.1.2	<i>Pufferrezepturen</i> .....	22
2.1.3	<i>Geräte</i> .....	23
2.1.4	<i>Verbrauchsmaterial</i> .....	25
2.2	UNTERSUCHUNGSMATERIAL .....	26
2.3	METHODEN .....	27
2.3.1	<i>DNA-Extraktion</i> .....	27
2.3.2	<i>Amplifikation Zygomyzeten-spezifischer DNA</i> .....	29
2.3.3	<i>Gelelektrophorese der Amplifikate</i> .....	33
2.3.4	<i>Bestimmung der Nachweisgrenze</i> .....	33
2.3.5	<i>Amplifikation Aspergillus-spezifischer DNA</i> .....	33
2.3.6	<i>Kontrollen</i> .....	37
2.3.7	<i>Multiplex-Verfahren</i> .....	43
2.3.8	<i>Aufreinigung und Sequenzierung der Amplifikate</i> .....	44
2.3.9	<i>Fragmentextraktion aus dem Agarosegel</i> .....	46
2.3.10	<i>Klonierung</i> .....	47
2.3.10.1	<i>Ligation</i> .....	48
2.3.10.2	<i>Transformation</i> .....	48
2.3.10.3	<i>Ausplattieren und Picken</i> .....	49
2.3.10.4	<i>Plasmid-Miniprep</i> .....	49
2.3.10.5	<i>Kolonie-PCR</i> .....	50
2.3.10.6	<i>Cycle Sequencing</i> .....	51
2.4	STATISTIK .....	52
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>53</b>
3.1	PCR-ERGEBNISSE DER PARAFFIN EINGEBETTETEN GEWEBEPROBEN .....	53
3.2	PCR-ERGEBNISSE NATIVER BIOPSIEN .....	57
3.3	IDENTIFIZIERUNG DER ZYGOMYZETEN-PCR-PRODUKTE .....	58
3.4	NACHWEIS DER ZYGOMYZETENSPEZIES IN DEN VERSCHIEDENEN ORGANEN .....	59

3.5	ORGANBEZOGENE PCR-DIAGNOSTIK .....	61
3.6	VERGLEICH DER PCR-ERGEBNISSE MIT KULTUR- UND HISTOLOGIE-DATEN .....	61
3.6.1	<i>Nachweisgrenze der PCR-Methoden</i> .....	62
3.6.2	<i>Sensitivität und Spezifität der PCR-Methoden</i> .....	62
3.7	KONTROLLEN.....	66
3.8	MULTIPLEX-VERFAHREN .....	66
3.9	FRAGMENTEXTRAKTION AUS DEM AGAROSEGEL.....	67
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>67</b>
4.1	FAZIT .....	79
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>82</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>97</b>

## Abkürzungen

Neben Standardabkürzungen wurden international gebräuchliche SI-Einheiten verwendet.

μ	Mikro-
μl	Mikroliter
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
g	Gramm
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	Ampuwa <sup>®</sup> (Wasser für Injektionszwecke)
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	bidestilliertes Wasser zur Verdünnung
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
M	Molar
MEK	minimal effektive Konzentration
mg	Milligramm
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt

# 1 Einleitung

Der Erfolg lebensrettender Therapien in der Hämatologie-Onkologie (Picardi et al., 2003, Subira et al., 2002, Pagano et al., 2004) und in der Transplantationsmedizin (Minari et al., 2002, Karacan et al., 2003, Lin et al., 2003) ist durch das Auftreten von Infektionen gefährdet. Dabei sind bakterielle Infektionen durch die Gabe von Antibiotika, gegebenenfalls auch als Prophylaxe, weitgehend beherrschbar (Carretto et al., 2000, Venditti et al., 2003). Virusinfektionen sind wesentlich schwieriger zu therapieren (Bosi et al., 2002) und Pilzinfektionen spielen für das Überleben eine zunehmend größere Rolle (Pfaller and Diekema, 2004). Bei malignen hämatologischen Erkrankungen sterben bis zu 51% der Patienten an einer Pilzinfektion (Pagano et al., 2001). Dabei rufen vor allem invasive Pilzinfektionen des Respirationstraktes schwere Komplikationen bei immunsupprimierten Patienten hervor (Fridkin and Jarvis, 1996). Die häufigsten Erreger sind Hefepilze der Gattung *Candida* sowie Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* und der Ordnung Mucorales (Eucker et al., 2001). Schimmelpilzinfektionen sind durch eine rasche Progredienz und hohe Letalität charakterisiert (Denning, 1996, Husain et al., 2003), der vermutlich nur durch eine frühzeitige Diagnostik und Therapie begegnet werden kann (Pagano et al., 2004).

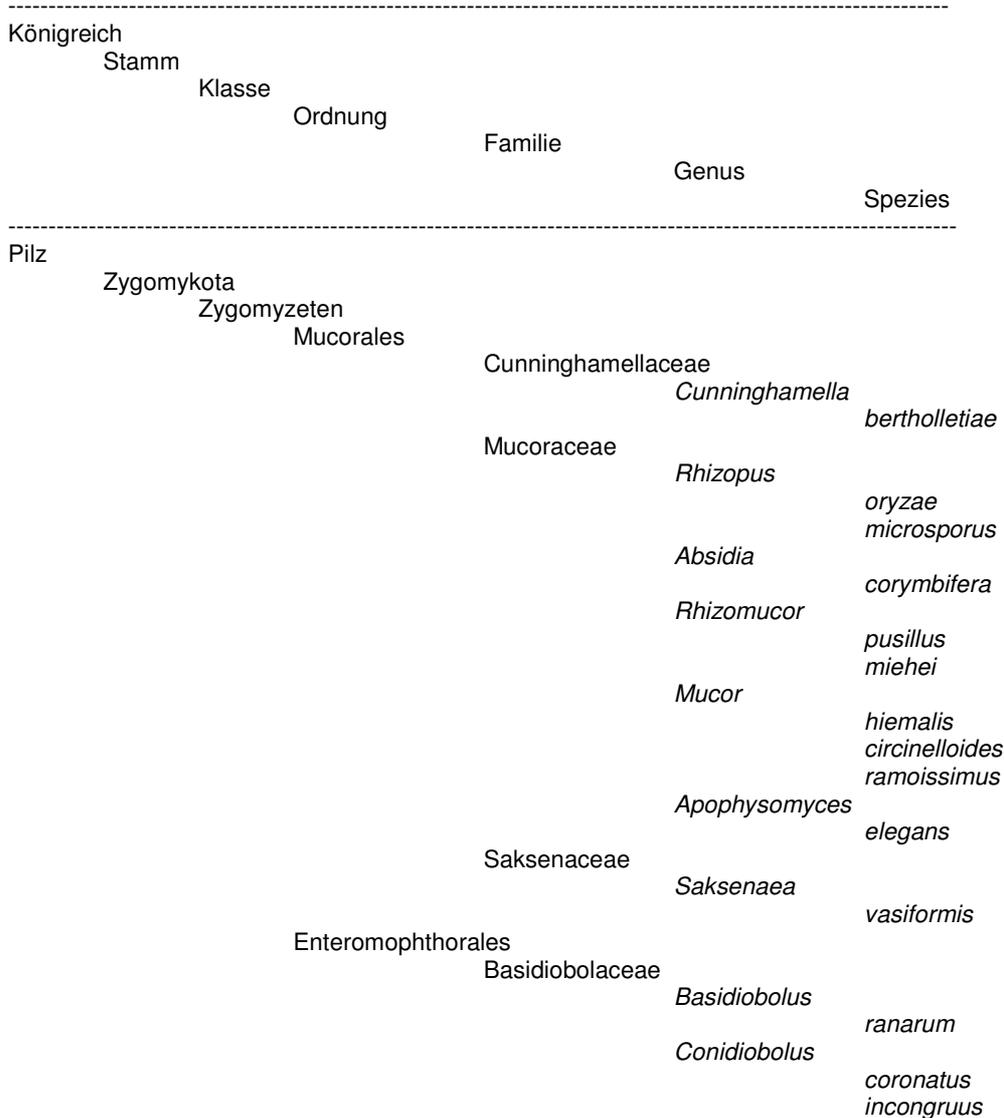
## 1.1 Zygomycosen und Aspergillosen

### Epidemiologie der Zygomycosen

Zygomyceten sind ubiquitär verbreitete Fadenpilze, die taxonomisch in zwei große Ordnungen, die Enteromorphothales und die Mucorales, unterteilt werden (siehe Tab. 1). Die Enteromorphothales verursachen chronische, langsam progrediente subkutane Erkrankungen bei meist immunkompetenten Patienten im tropischen Klima (Ribes et al., 2000). Die Mucor-Mykose dagegen ist eine akute, nekrotisierende, schnell fortschreitende Krankheit, die fast ausschließlich bei immunsupprimierten Patienten beobachtet wird. In der

Literatur werden die beiden Begriffe Mucor-Mykose und Zygomycose oft als Synonym verwendet, wenngleich Zygomycose umfassender ist.

**Tab. 1:** Aufteilung der Zygomyzeten in Mucorales und Enteromophthorales (modifiziert nach Ribes et al., 2000)



In einer Studie am M. D. Anderson Krebszentrum in Texas wurde in Autopsien eine zunehmende Inzidenz der Mucor-Mykose beobachtet: sieben Erkrankungen pro 100.000 Aufnahmen wurden während der Jahre 1989-98 diagnostiziert, acht von 1989-93 und von 1994-98 waren es 17 Mucor-Mykosen (Kontoyiannis et al., 2000). Mucor-Mykosen repräsentieren 8,3-13% aller nachgewiesenen Pilzinfektionen in Autopsien hämatologischer Patienten

(Funada and Matsuda, 1996, Nosari et al., 2000) und treten auch nach Transplantationen auf. Die Inzidenz liegt hier, in Abhängigkeit vom transplantierten Organ, zwischen 0 und 1,9% (Wajszczuk et al., 1985, Miller et al., 1994 a, Nampoory et al., 1996, Maertens et al., 1999 a, Grossi et al., 2000, Ruffini et al., 2001, Jimenez et al., 2002). Die Letalität der Zygomycose wird mit 60 – 100% in verschiedenen Studien beziffert (Herbrecht et al., 2001, Husain et al., 2003).

Als opportunistische Krankheitserreger beim Menschen sind vor allem Pilze der Gattungen *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Absidia*, *Cunninghamella* und *Mucor* von Bedeutung (De Hoog, 1995). Wie in Tabelle 2 dargestellt, werden bis zu fünf Verlaufsformen der Zygomycose beschrieben, nämlich eine pulmonale, eine disseminierte, eine kutane, eine gastrointestinale und eine rhino-orbito-cerebrale Mucor-Mykose (Ribes et al., 2000). Bei Letzterer kann es nach einer Besiedelung der Schleimhäute des Respirationstraktes und der Nasennebenhöhlen zu einer Ausbreitung in den retroorbitalen Raum oder in das zentrale Nervensystem kommen. Die Pilzpneumonie ist progressiv, ahmt die invasive Aspergillose nach (Kontoyiannis et al., 2000) und endet unbehandelt innerhalb von zwei bis drei Wochen tödlich. Die klinischen Symptome sind unspezifisch wie unklares Fieber, eventuell auch Hämoptysen und Pleuraschmerzen. Ebenso gefährlich, wenn auch selten, ist eine gastrointestinale Mucor-Mykose. Sie ist häufig mit einer schweren Malnutrition assoziiert oder einer, v. a. bei onkologischen Patienten auftretenden, Mukositis.

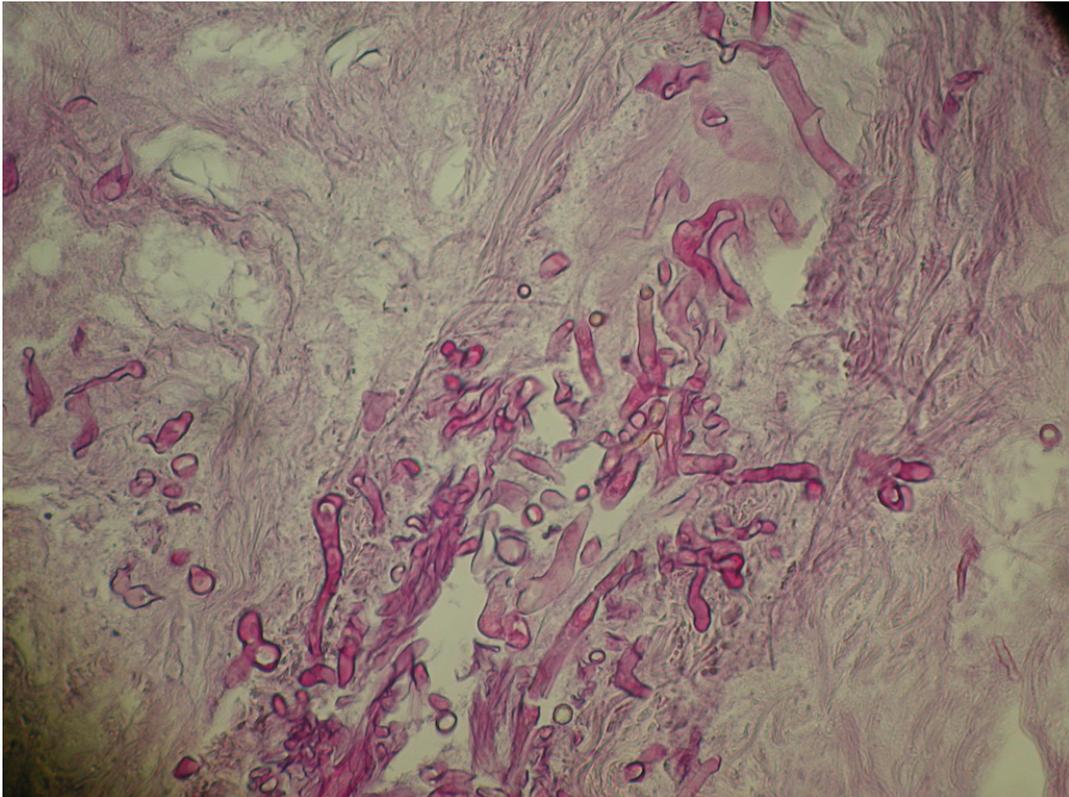
**Tab. 2:** Klinische Formen der Mucor-Mykose nach ihrer Häufigkeit (zusammengestellt nach Espinel-Ingroff et al., 1987, Chakrabarti et al., 1997, Sugar, 2000)

Rhino-orbito-cerebrale Form	44-49%
Kutane Form	10-16%
Pulmonale Form	10-11%
Disseminierte Form	6-11,6%
Gastrointestinale Form	2-11%

Infektionen mit Zygomyceten sind bei immunkompetenten Patienten eine Rarität (Ferrinho, 1985, Lake et al., 1988). Der Pathomechanismus ist noch weitgehend ungeklärt. Disponiert für Zygomykosen sind Patienten mit Diabetes mellitus (Elgart, 1996), malignen Erkrankungen (Fridkin and Jarvis, 1996), Unterernährung (Lehrer et al., 1980), Verbrennungen (Vainrub et al., 1988), Polytraumata und Patienten unter immunsuppressiver Therapie durch Gabe von Chemotherapeutika und Kortikosteroiden, Patienten mit Desferrioxamin-Therapie und Patienten mit HIV-Infektion (Scully et al., 1997). Bei allen Risikopatienten kann es zur hämatogenen Streuung und damit zur disseminierten Infektion kommen.

Als Hauptrisikofaktoren für eine Mucor-Mykose gelten eine maligne hämatologische Erkrankung, v. a. Leukämie und Lymphome (Ingram et al., 1989), und/oder eine Neutropenie ( $< 500$  Neutrophile/mm<sup>3</sup>) (Kontoyiannis et al., 2000, Nosari et al., 2000).

Im Gewebe imponieren die Hyphen einer Mucor-Mykose breit und bandartig, von 6 bis 16  $\mu$ m Durchmesser (Ribes et al., 2000). Typisch sind rechtwinklige Verzweigungen sowie fehlende oder nur wenige Septen (siehe Abb. 1).



**Abb. 1:** PAS gefärbte Pilzelemente im Gewebeschnitt bei kulturell gesicherter Mucor-Mykose mit *Absidia corymbifera* (Originalvergrößerung 400fach)

### **Epidemiologie der Aspergillosen**

Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Die Inzidenz der invasiven Aspergillose ist abhängig von der Grunderkrankung, wie in Tabelle 3 dargestellt. Die mit Aspergillose assoziierte Letalität liegt trotz Therapie zwischen 50 und 100% (Denning, 1996).

Etwa 90% der Aspergillosen werden durch die Spezies *Aspergillus fumigatus* verursacht, daneben kommen *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* und *A. nidulans* vor (Perea and Patterson, 2002).

Typischerweise gelangen die in der Luft enthaltenen Aspergillussporen durch Inhalation in den Respirationstrakt und können bei vorhandener Immunschwäche zur invasiven pulmonalen Aspergillose führen. Diese Form der invasiven Aspergillose ist mit 80-90% die häufigste (Denning, 1998). Symptome einer pulmonalen Aspergillose sind relativ unspezifisch wie trockener Husten, Luftnot, Pleuraschmerzen, Fieber, eventuell auch Hämoptysen (Denning, 1998). Die Erkrankung verläuft unbehandelt bei immunsupprimierten Patienten

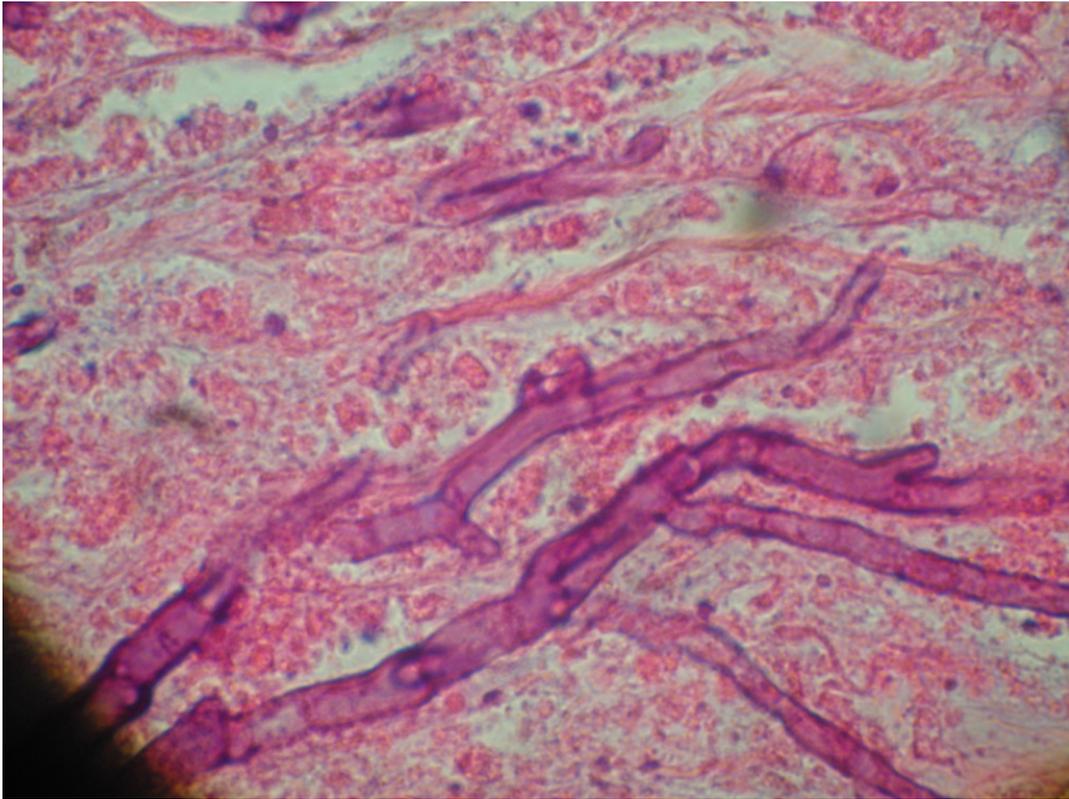
innerhalb von 14 Tagen tödlich (Denning, 1998). Bei Patienten mit geringer Abwehrschwäche, wie Diabetikern, oder bei immunkompetenten Patienten ist der Verlauf länger, hier können zwei bis drei Monate von den ersten Symptomen bis zum Tod vergehen (Denning, 1998).

**Tab. 3:** Inzidenz der invasiven Aspergillose in Bezug auf die Grunderkrankung der Patienten (modifiziert nach Denning, 1998)

<b>Grunderkrankung</b>	<b>Inzidenz (in %)</b>
Herz- und/oder Lungentransplantation	19-26*
Septische Granulomatose	25-40 <sup>†</sup>
Akute Leukämie	5-24
Allogene KMT	4-9
AIDS	0-12
Lebertransplantation	1,5-10
Herz- und Nierentransplantation	0,5-10
Schwere kombinierte Immundefekte (SCID)	3,5
Verbrennungen	1-7
Systemischer Lupus erythematodes	1

\* = Unterscheidung zwischen Kolonisation und Krankheit ist bei diesen Patienten besonders schwierig, KMT = Knochenmarkstransplantation, † = Inzidenz zu Lebenszeit, SCID = severe combined immunodeficiency

Das histologische Merkmal (siehe Abb. 2) ist ein gleichmäßig breites, sich spitzwinklig aufzweigendes Myzel. Typisch für Aspergillen sind die septierten Hyphen.



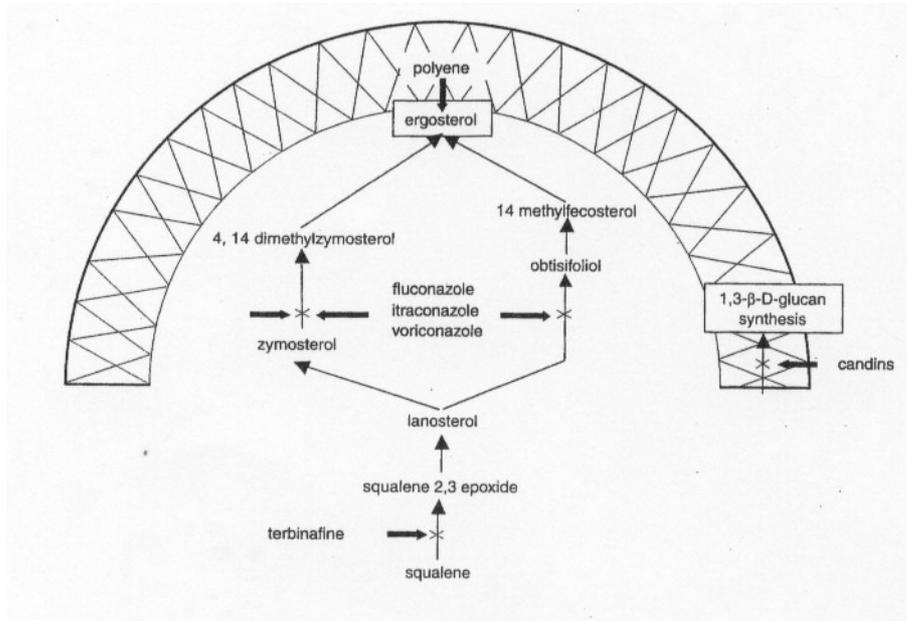
**Abb. 2:** PAS gefärbte Hyphen im histologischen Präparat bei kulturell gesicherter Schimmelpilzinfektion mit *Aspergillus fumigatus* (Originalvergrößerung 1000fach)

## 1.2 Therapie von Aspergillosen und Zygomykosen

Beide Infektionen werden seit Jahrzehnten systemisch mit Amphotericin B, mittlerweile auch in liposomaler Form erhältlich, therapiert. Dieses Breitspektrumantimykotikum kann durch seine Nephro- und Neurotoxizität schwere Nebenwirkungen verursachen. Neuere Medikamente die gegen *Aspergillus* spp. wirksam sind, wie die Azolderivate Itraconazol, Voriconazol und Posaconazol haben durch eine geringere Toxizität eine größere therapeutische Breite. Das Echinocandin Caspofungin setzt an der Hemmung der  $\beta$ -(1,3)-D-Glukan-Synthese der Pilzzellwand an (siehe Abb. 3) und zeigt eine gute Wirksamkeit gegen ansonsten schwer therapierbare Aspergillosen.

Die in vitro nachgewiesene Sensitivität gegen Amphotericin B, Azolderivate und Caspofungin ist isolat- und speziesabhängig (Diekema et al., 2003).

Insbesondere Caspofungin und neuere Azolderivate zeigen eine nur geringe Wirksamkeit gegen Erreger von Zygomycosen (Sun et al., 2002, Donnelly and De Pauw, 2004, Pfaller and Diekema, 2004).



**Abb. 3:** Wirkorte von Antimykotika im Stoffwechsel von Pilzen (nach Donnelly und De Pauw, 2004)

Neben der medikamentösen Therapie von Aspergillosen und Zygomycosen wird zusätzlich die chirurgische Exzision der nekrotischen Läsionen und die Restaurierung des Immunstatus des Patienten, z. B. durch Dosisreduktion der Chemotherapie und der Gabe von Granulozytenkolonien stimulierender Faktor (G-CSF) zur Reduktion der Neutropenie, empfohlen (Weng et al., 1998, Wu et al., 2004).

### 1.3 Differenzialdiagnostik von Aspergillosen und Zygomycosen

#### Radiologische Differenzialdiagnostik

Röntgenthoraxaufnahmen bei invasiver Aspergillose zeigen sehr heterogene Erscheinungsbilder (Pasmans et al., 1992, Miller et al., 1994 b, Logan et al., 1995, von Eiff et al., 1995) und sind anfangs nicht selten unauffällig, während die Computertomographie bereits frühzeitig verdächtige Zeichen aufweisen

kann (Caillot et al., 1997, Kim et al., 2001, Hauggaard et al., 2002, Kami et al., 2002). Als typisch gelten das „Halo“-Zeichen (milchglasartige Trübung um ein dichtes Infiltrat) oder das „air-crescent“-Zeichen (Lufteinschluss in einer Einschmelzung) (Caillot et al., 2001), jedoch erlauben diese keine Differenzierung zwischen Aspergillosen und Mucor-Mykosen (Denning, 1998). Zudem sind diese Zeichen nicht pathognomonisch für Pilzinfektionen. Sie charakterisieren infarzierte Lungenareale ohne die Ätiologie wiederzugeben (Abramson, 2001, Pinto, 2004).

### **Kultureller Nachweis**

Aspergillen und Zygomyceten können prinzipiell mit Hilfe der Kultur einer steril gewonnenen Probe identifiziert werden (Ascioglu, 2002). Die Sensitivität der Kulturen ist aber sehr niedrig (Ribes et al., 2000, Nosari et al., 2003). Selbst bei Operationsmaterial und Biopsaten gelingt die Erregeranzucht in nur 30% (Tarrand et al., 2003). Zudem ist eine Interpretation einer Pilzkultur aus Atemwegsmaterialien wegen des ubiquitären Vorkommens der Erreger in der Umwelt nicht immer eindeutig. Es könnte auch eine Kolonisierung der Atemwege ohne Infektion vorliegen (Soubani et al., 2004). Dies kommt insbesondere bei immunsupprimierten Patienten vor (Westney et al., 1996, Wald et al., 1997).

### **Histologischer Nachweis**

Für den Nachweis von Pilzelementen sollten Gewebeschnitte mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) oder besser noch mit Grocott Methanaminsilber (GMS) oder mit Perjodsäure-SCHIFF-Reagenz (PAS) gefärbt werden. Aber auch bei diesen Spezialfärbungen ergeben sich Schwierigkeiten bei der Zuordnung der Pilzinfektion, v. a. bei Zygomycosen. Aufgrund einer schlechten Anfärbung der Pilzstrukturen und einem geringen Kontrast mit dem restlichen Gewebe können die Erreger nicht immer eindeutig zugeordnet werden (Hayden et al., 2002).

Histologisch kann nicht immer das Reich, die Ordnung oder die Gattung des infizierenden Pilzes bestimmt werden, besonders wenn keine reproduktiven Strukturen des Pilzes im Gewebeschnitt erkennbar sind (Hayden et al., 2002).

Die Differenzierung zwischen Aspergillosen und Zygomycosen ist dabei besonders schwierig. Zygomyceten haben zwar keine bzw. wenige Septen, aber die Hyphen kollabieren stellenweise und täuschen so Septen vor. Demzufolge wird eine Zygomycose gelegentlich als Aspergillose interpretiert (Hayden et al., 2002). Eine Speziesidentifizierung, die epidemiologisch und vor allem therapeutisch erforderlich ist, kann mit der alleinigen histologischen Untersuchung nicht erzielt werden (Denning, 1998).

### **Immundiagnostik**

**Aspergillen.** Das zirkulierende immundominante Polysaccharidantigen Galaktomannan kann zur Diagnose einer invasiven Aspergillose genutzt werden. Dieser Test mit einem monoklonalen Antikörper ist sehr sensitiv (Maertens et al., 1999 b), jedoch wird von einer Rate von ca. 10% falsch positiver Ergebnisse berichtet (Verweij und Denning, 1997). Der Aspergillus-Antigen-ELISA reagiert unter anderem mit mehreren Arten von Lebensmitteln die Getreide enthalten, aber auch mit Dosengemüse aus dem Supermarkt und bei Patienten unter Antibiotikatherapie (Ansorg et al., 1997, Letscher-Bru et al., 1998, Walsh et al., 2004). Es wird angenommen, dass hitzeresistentes Galaktomannan die gestörte mukosale Barriere passieren und im Blut zirkulierend eine Antigenämie auslösen kann (Ansorg et al., 1997). Dies würde im ELISA zu positiven Ergebnissen führen, obwohl keine Infektion vorliegt. Der Test erlaubt weder eine Speziesidentifizierung noch können Zygomycosen nachgewiesen werden (Maertens et al., 2001).

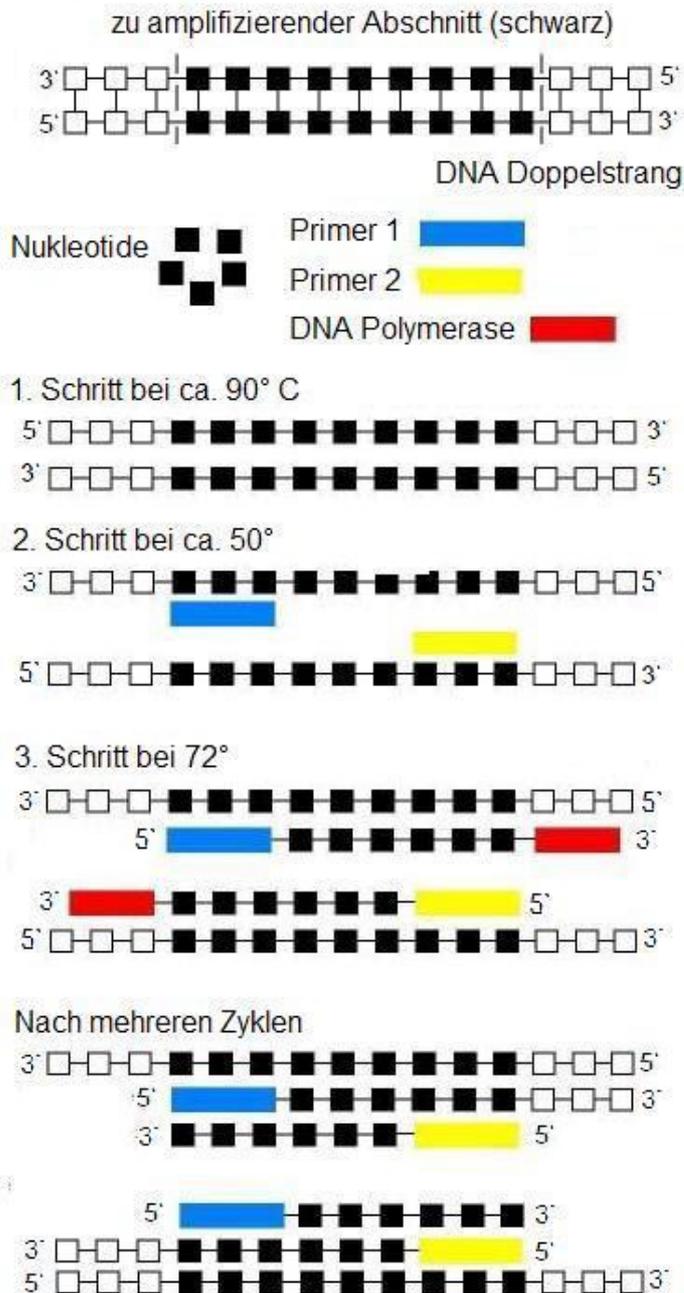
Ein immundominantes Proteinantigen, Mitogillin, ruft eine frühe und starke Antikörperantwort bei Patienten mit Aspergillose hervor. Der Antikörpernachweis gegen Mitogillin nach Weig et al. (2001) scheint mit einer Spezifität von 95,4% und einer Sensitivität von 62,5 bis 100% ein guter Marker zur Serodiagnostik zu sein. Allerdings haben Patienten mit invasiver Aspergillose meistens ein reduziertes Antikörperbildungsvermögen, was deren Nachweis erschwert. Ein Antikörpersuchtest wird oft erst nach Einsetzen der Therapie, wenn sich der klinische Zustand der Patienten verbessert, positiv (Denning, 1998).

**Zygomyceten.** Die Entwicklung serologischer Nachweismethoden von Zygomycosen hat sich als schwierig erwiesen und ist bisher klinisch nicht relevant (Ribes et al., 2000). In mehreren Laboratorien wurden Antigene von Zygomyceten zur Entwicklung immundiagnostischer Verfahren charakterisiert (Hessian und Smith, 1982, Yankey und Abraham, 1983, Kaufman et al., 1989). Es zeigte sich, dass Zygomyceten mehrere Antigene miteinander teilen. Hessian und Smith (1982) berichteten über die vielen gemeinsamen Antigene von *Absidia corymbifera* und *Mucor pusillus* und Jensen et al. (1994) wiesen Kreuzreaktionen zwischen *Absidia corymbifera* und *Rhizopus oryzae* beim Nachweis boviner Zygomycosen nach. Kaufman et al. (1989) entwickelten einen ELISA-Test mit einer Sensitivität von 81% und einer Spezifität von 94%. Es kam aber zu Kreuzreaktionen mit Erregern von Aspergillosen und Candidosen, so dass die Autoren feststellten, dass mit den momentan bekannten Antigenen ein ELISA-Test das ätiologische Agens nicht identifizieren kann. Hitchcock et al. (1997) testeten einen monoklonalen Antikörper zur Detektion von Basidiomyceten, der aber mit Zygomyceten kreuzreagierte. Ein immundiagnostischer Test zum Nachweis von Zygomyceten spezifischer Antikörper oder Antigenen ist derzeit kommerziell nicht verfügbar.

### **PCR-Verfahren zur Diagnostik**

Die 1984 von Kary Mullis entwickelte Methode der PCR (Polymerase chain reaction) dient der Vervielfältigung von DNA-Abschnitten bekannter Sequenzen. Hierfür werden die DNA mit dem zu amplifizierenden Abschnitt, zwei Primer, eine hitzebeständige DNA-Polymerase und Nukleotide benötigt. Typische Primer sind 15 bis 25 Basen lange Oligonukleotidsequenzen, die zu den beiden Randbereichen eines Zielabschnittes eines Gens komplementär sind. Es wird zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primern unterschieden. Die PCR besteht im Allgemeinen aus drei Reaktionen. Zunächst wird das Reaktionsgemisch auf über 90°C erhitzt und damit die DNA in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt. Mit der Abkühlung auf ca. 50°C wird ein Anlagern der Primer an die beiden Einzelstränge ermöglicht. Anschließend wird bei einer Temperatur von 72°C die DNA-Polymerase aktiviert, die dann an die Primer bindet und den jeweiligen

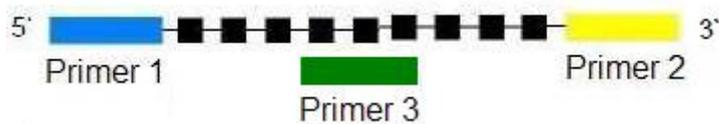
DNA-Abschnitt amplifiziert (siehe Abb. 4). Nach bereits 25 Zyklen ist die Zielsequenz um das ca.  $10^6$ -fache vervielfältigt.



**Abb. 4:** Schematischer Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion

Um die Spezifität und die Sensitivität zu erhöhen, kann in einem zweiten PCR-Verfahren ein Teilstück des zunächst amplifizierten Zielabschnittes nochmals vervielfältigt werden. Dazu werden zwei neue Primer benötigt, deren

Bindungsstellen innerhalb des Zielabschnittes liegen. Dieses Verfahren wird als nested PCR bezeichnet. Bei einer semi-nested PCR liegt bei der zweiten PCR ein Primer innerhalb des Zielabschnittes, der zweite Primer entspricht entweder dem Vorwärts- oder Rückwärts-Primer der ersten PCR (siehe Abb. 5).



**Abb. 5:** Bindungsstellen der Primer bei einer semi-nested PCR

Es existieren bereits verschiedene PCR-Verfahren mit denen erfolgreich Pilzspezies identifiziert werden (Makimura et al., 1994, Kappe et al., 1998). Typischerweise werden hier Kulturen mit PCR-Verfahren untersucht, deren Zielregion in Genen liegt, die in vielen Kopien im Genom vorliegen. Im Unterschied zu Genen, bei denen nur eine Kopie pro Genom vorliegt, steigt so die Nachweiswahrscheinlichkeit mit der PCR. Hierfür eignet sich vor allem die in bis zu 100 Kopien pro Genom vorliegende ribosomale DNA (Maicas et al., 2000, Tsuchiya and Taga, 2001), die zu den konservierten Genen gehört (Wu et al., 2003).

Mit Aspergillus- und Zygomyceten-spezifischen PCR-Verfahren mit anschließender Sequenzierung der Amplifikate könnte der Erregernachweis und die Differenzierung innerhalb weniger Tage durchgeführt und damit die Therapiemöglichkeiten dieser lebensbedrohlichen Schimmelpilzinfektionen möglicherweise entscheidend verbessert werden.

## 1.4 Ziele der Arbeit

- Entwicklung eines sensitiven PCR-Verfahrens  
zum DNA Nachweis und Identifizierung von humanpathogenen  
Zygomyceten in Gewebeproben
- Aufbau einer semi-nested PCR  
zum DNA Nachweis von *Aspergillus fumigatus* in Gewebeproben
- Evaluation beider PCR-Methoden zur Differenzialdiagnostik von Aspergillosen  
und Zygomykosen in Gewebeproben

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Reagenzien und Geräte

Kommerziell erhältliche Reaktions-Systeme (Kits)

ABI PRISM <sup>®</sup> Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Foster City, USA
Centri-Sep <sup>®</sup> Spin Columns	Princeton Separations Inc., Adelphia, USA
Perkin Elmer AmpliTaq <sup>®</sup> DNA-Kit	Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA
QIAamp <sup>®</sup> Mini Kit 250	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
TOPO-TA-Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

### 2.1.1 Enzyme und Chemikalien

Agar-Agar	Merck, Darmstadt
Agarose NEEO Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa <sup>®</sup>	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Aqua ad iniectabilia Mini-Plastico	Braun, Melsungen
Blue Dextran	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Bromphenolblau (BPB)	Sigma, Deisenhofen
Desoxynukleosid-Triphosphat Set (100 mM each dNTP)	Promega, Madison, WI., USA
DNA Molekulargewichtsmarker VIII	Boehringer, Mannheim
100 bp DNA-Leiter, äquimolar	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetrassigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Becton Dickinson, Cockeyville, USA
LiChrosolv	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Meliseptol <sup>®</sup> Braun	Braun, Melsungen
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide, Sequenzierstandard	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)amoniomethan	Sigma, Deisenhofen
Trizma base	Sigma, Deisenhofen
Trypticase peptone	Becton Dickinson,

## 2.1.2 Pufferrezepturen

Agarosegel - Ladepuffer:

10x Stocklösung:

250 mg	Bromphenolbraun
60 ml	Glycerin
33 ml	Trizma base pH 7,6 (150mM)
7 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>

Zu 100 µl dieser Lösung wurden 450 µl Glycerin und 450 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gegeben, um den verwendeten 1x Ladepuffer zu erhalten.

5x Bromphenolblaupuffer:

50 mM	Tris, pH 7,6
50 mM	EDTA
0,5 %	SDS
0,1 %	Bromphenolblau
18,0 %	Ficoll 400 ad Aqua

5x – Dextranpuffer:

10 mM	EDTA
0,4 %	Blue Dextran
40,0 %	Glycerin ad Aqua

50x TAE-Puffer:

2,0 M	Tris, pH 8,0
1,0 M	Eisessig
0,5 m	EDTA ad Aqua

#### LB-Medium:

10 g	Trypticase peptone
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl

Mit dem pH-Meter wurde durch Zugabe von Säure bzw. Lauge der pH auf 7,0 eingestellt. Um Sterilität zu gewährleisten wurde das LB-Medium autoklaviert.

#### LB-Agar:

10 g	Trypticase peptone
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl

Durch Zugabe von Säure bzw. Lauge erfolgte mit dem pH-Meter die exakte pH-Einstellung auf pH 7,0. Das LB-Medium wurde autoklaviert um Sterilität zu gewährleisten.

15 g	Agar-Agar
------	-----------

### 2.1.3 Geräte

#### Brutschrank:

Brutschrank	Heraeus, Hanau
-------------	----------------

#### Gefäße:

Reaktionsgefäßklemmständer	Eigenbau
----------------------------	----------

#### Gelkammern:

Jeweils 2 x 10 Taschen	MWG Biotech, Ebersberg
MWG Biotech	
Peqlab	Peqlab, Erlangen
Sratagene	Sratagene, Cedar Creek, TX, USA

Heizplatte/Magnetrührer:

Ikamaq® RH

IKA Works, Wilmington, USA

Kamera:

Polaroid Direct Screen Instand  
Camera DS B4 mit Electrophoresis  
Hood EPH-6  
Polaroid Pos/neg Instand Pack  
Film 665 ISO 80/20°

Polaroid, Offenbach

PCR-Geräte:

Primus 96 plus Thermocycler  
Hybaid Omn-E

MWG Biotech, Ebersberg  
Hybaid, ThermoLife Science,  
Ebersberg

pH-Meter:

pH-Meter

Ingold, Escolab, Niederlande

Pipetten:

Carl Roth Pipetten  
Eppendorf Pipetten  
Gilson Pipetten

Roth, Karlsruhe  
Eppendorf, Hamburg  
Abimed, Langenfeld

Sequenziergerät:

373 Automated DNA Sequencer  
ABI Genetic Analyser 3100

Applied Biosystems,  
Perkin Elmer, Foster City, USA

SpeedVac:

Vacuum Concentrator

Bachofer, Reutlingen

Schüttler:

Eppendorf Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

MS Minishaker IKA®	IKA Works, Wilmington, USA
Sterilwerkbank:	
LaminarFlow	Kendro, Ashville, USA
Vortexgerät:	
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waagen:	
Microtom	R. Jung, Heidelberg
Mettler PM 4000 Waage	Mettler Toledo, Columbus, OH, USA
TH 25 / SM 25	E. Bühler, Tübingen
Wasserbad:	
Julabo U3 / B	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen:	
Biofuge 13	Heraeus Sepatech, Hanau
CR 4 22	Jouan, Saint Mazaire, Frankreich

#### **2.1.4 Verbrauchsmaterial**

Pipettenspitzen:	
Biozyme budgetline® SafeSeal-Tips	Biozyme, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße:	
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt, Numbrecht

## 2.2 Untersuchungsmaterial

Es wurden insgesamt 77 Proben untersucht. Davon waren 66 in Paraffin eingebettete Gewebeproben. Es handelte sich, mit der Ausnahme von zwei Rentierproben, um humane Gewebeproben. Davon wurden 28 dem Nasen-Rachenraum, 23 der Lunge, drei der Leber, zwei dem Auge, zwei der Niere, zwei einem Muskel, zwei dem ZNS, eine der Haut und eine dem Gefäßsystem entnommen. Es kamen 20 Proben aus der Universitätsklinik Frankfurt, 18 aus Monterrey, Mexiko, 16 aus der Universitätsklinik Wien, neun aus der Universitätsklinik Innsbruck und eine aus dem Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen. Die zwei Rentierproben stammten aus dem Institut für Veterinärmedizin der Universität Wien.

Bei den 66 Paraffin eingebetteten Gewebeproben lag der histologische Nachweis oder der Verdacht auf eine Mykose oder Anzucht von Pilzen aus Proben des eingebetteten Organs oder aus anderen Proben des Patienten vor. Im Einzelnen gab es bei 27 der Proben Hinweise auf eine Zygomycose, bei 18 den der Aspergillose, bei drei wurde histologisch eine invasive Mykose ohne genauere Zuordnung beschrieben. Bei sechs der 66 Proben wurde histologisch eine Doppelinfektion mit Zygomyceten und Aspergillen vermutet, bei zwei eine Mischinfektion von *Mucor* und *Candida* spp. und einmal wurde eine Kryptokokkeninfektion angenommen. Sieben Proben stammten von Patienten bei denen ausschließlich der klinische Verdacht einer invasiven Mykose bestand. Bei einer Probe lag beim Patienten zunächst der Verdacht einer Pseudallescheriainfektion vor, der aber histologisch oder kulturell nicht gesichert werden konnte. In einer der 66 Proben konnten histologisch keine Pilze nachgewiesen werden, aber die vom Patienten kommende bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde in einer auswärts durchgeführten Aspergillus-PCR positiv.

Gewebeschnitte der Luftwege wurden in dieser Studie bevorzugt. Zum einen finden sich hier vorrangig die Schimmelpilzinfektionen und zum anderen kann durch kolonisierende oder kontaminierende ubiquitäre Pilzsporen die Diagnostik erschwert werden.

Bei elf der 77 Proben handelte es sich um native Biopsien, wovon neun intra vitam entnommen worden waren. Zwei dieser Biopsien stammten aus der Leber und eine aus der Haut. Die restlichen sechs Biopsien wurden der Lunge entnommen, eine am offenen Thorax und fünf CT- gesteuert mittels Feinnadel. Ebenfalls aus der Lunge stammten die zwei post mortem entnommenen Biopsien. Alle Proben wurden anonymisiert. Bei jeder Biopsie bestand klinisch der Verdacht auf eine Pilzinfektion.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 DNA-Extraktion**

**DNA-Extraktion aus Paraffinschnitten.** Mit dem Mikrotom wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte pro Gewebeblock angefertigt. Zwei bis vier dieser Schnitte wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle weiteren Arbeitsschritte unter der LaminarFlow durchgeführt. Zur DNA-Extraktion wurde das QIAamp-Mini-Kit von Qiagen verwendet. Zur Entparaffinierung wurden 1000 µl Xylol zu den Schnitten pipettiert. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße 5 Min. bei RT im Thermoshaker geschüttelt. Nach dreiminütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert um nochmals, zur Entfernung des restlichen Paraffins, 1000 µl Xylol in die Eppendorfgefäße zu geben. Weitere 5 Min. Inkubation bei RT im Thermoshaker und nochmaliges Zentrifugieren bei 13.000 rpm für 3 Min. folgten. Der Überstand wurde, ohne das Gewebesediment zu zerstören, abpipettiert und 1000 µl Ethanol, zum Entfernen des Xylols, zugefügt. Die Inkubation erfolgte 5 Min. lang im Thermoshaker, gefolgt von dreiminütigem Zentrifugieren bei 13.000 rpm, was die Bildung eines Pellets bewirkte. Der Waschvorgang mit Ethanol wurde wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment zum vollständigen Trocknen in die Vakuum- Zentrifuge gegeben. Anschließend wurden 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Endkonzentration 1 mg/ml) auf das getrocknete Pellet pipettiert. Wenn das Pellet verhältnismäßig groß

erschien, wurden 40 µl Proteinase K zugegeben. Die Gewebeauflösung wurde durch Inkubation bei 56 °C und 900 rpm im Thermoshaker über Nacht erreicht.

Am folgenden Tag wurde das Wasserbad auf 100 °C erhitzt und das inzwischen verdaute Gewebesediment 5 Min. mit Hilfe eines Reaktionsgefäßklemmständers im Wasser gekocht. Durch das 30 Sek. lange Eintauchen des Klemmständers in ein mit Flüssigstickstoff gefülltes Gefäß (sog. Stickstoffbehandlung), wurde ein schnelles Einfrieren der Flüssigkeit im Reaktionsgefäß erreicht. Das Einfrieren in Flüssigstickstoff wurde insgesamt dreimal durchgeführt, zweimal von einem dreiminütigem und beim letzten Mal von einem fünfminütigem Kochen gefolgt. Das wiederholte Kochen und Einfrieren diente dem Aufbrechen der Pilzzellwände (Bialek et al., 2000).

Es wurden 200 µl AL-Puffer dem Reaktionsgefäß zugegeben. Nach einer Inkubation für 10 Min. bei 70 °C und 900 rpm im Thermoshaker wurden 200 µl Ethanol zugefügt und der Extraktionsansatz durchmischt. Nach Auftragen der gesamten Suspension auf eine Silikasäule und nach Zentrifugieren bei 8000 rpm für 1 Min. wurde das Tandem, bestehend aus befülltem Qiagen Silikasülchen und Auffanggefäß, getrennt, die Säule in ein neues 2 ml Auffangröhrchen gestellt und das Filtrat mit Auffanggefäß verworfen. Mit dem Auftragen von 500 µl AW 1 – Puffer und dem Zentrifugieren bei 8000 rpm für 1 Min. wurden Proteine und sonstige Verunreinigungen aus der Silikamembran gewaschen. Das erhaltene Eluat wurde verworfen und 500 µl AW 2 – Puffer auf die Säule gegeben, die dann bei 13.000 rpm für 3 Min. zentrifugiert wurde. Das Auffanggefäß wurde verworfen und die Silikasäulen in 1,5 ml Eppendorfgefäße gestellt. Zum Lösen der DNA von der Silikasäule wurden 50 µl AE-Puffer auf die Säule pipettiert. Der Eluationspuffer wirkte für 1 Min. bei RT ein. Anschließend wurde die Silikasäule im Eppendorfgefäß für 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen wurde der Auswaschvorgang mit 50 µl AE-Puffer wiederholt. Das insgesamt 100 µl fassende Extraktionseluat mit der gelösten DNA wurde bis zum Ansatz der verschiedenen PCRs bei 4-6 °C im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend, da die DNA bei längerer Lagerung in Flüssigkeit hydrolysiert, bei -20 °C eingefroren. Um eine Scherung der DNA

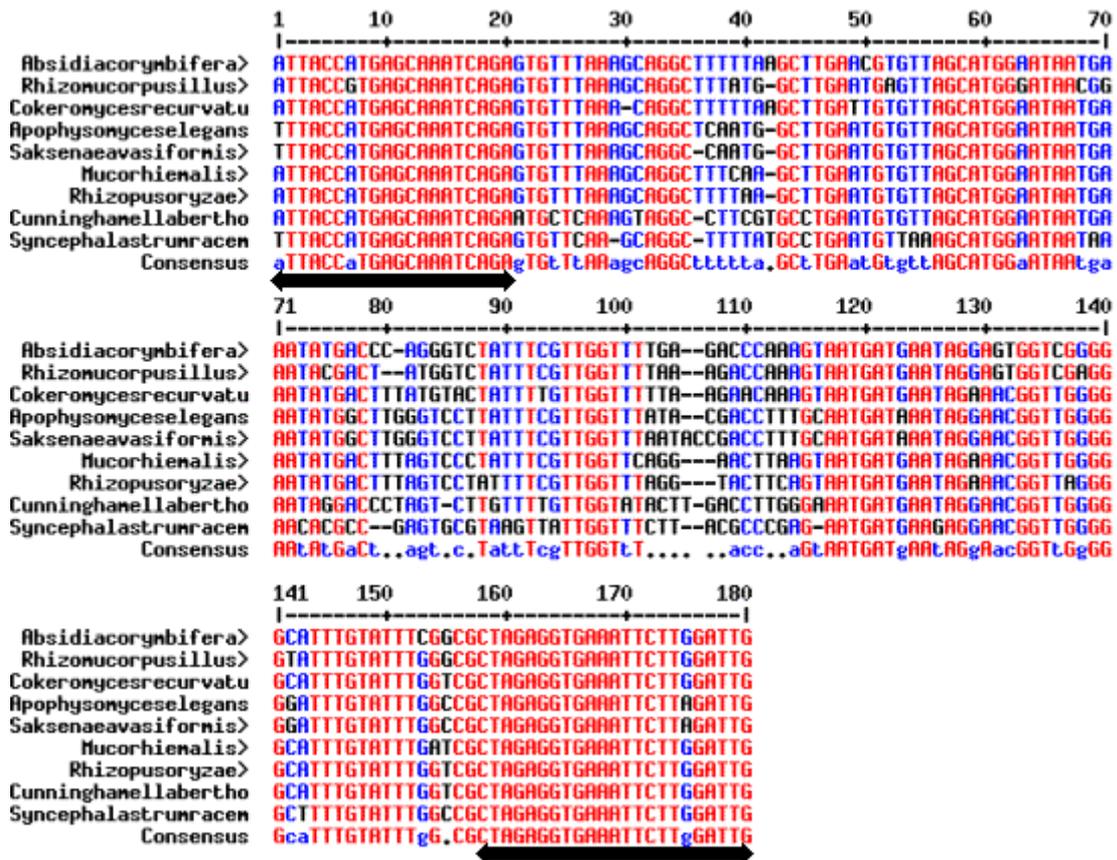
zu verhindern, wurde das wiederholte Auftauen und Einfrieren der Proben vermieden und die Proben portioniert eingefroren.

**DNA-Extraktion aus Biopsien.** Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die Biopsien einschließlich NaCl-Lösung unter der LaminarFlow in Gewebekulturschalen gegeben. Mit einem sterilen Skalpell wurden die Biopsien in möglichst kleine Stückchen zerteilt. Pro Biopsie wurden in der Regel mindestens zwei Extraktionsansätze mit möglichst identischen Biopsiemengen und jeweils 200 µl NaCl-Lösung angesetzt. Zu diesen Suspensionen wurden nun 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K (Endkonzentration 0,5mg/ml) gegeben. Die weiteren Schritte, inklusive mehrmaligem Einfrieren und Kochen, entsprachen dem zuvor Beschriebenen.

### 2.3.2 Amplifikation Zygomyceten-spezifischer DNA

**Primerdesign.** Als Zielsequenz wurde die 18S ribosomale DNA der Zygomyceten gewählt. Nach Vergleich wurde eine Region gefunden, die sich von der 18S rDNA von *Aspergillus* spp. deutlich unterscheidet, aber innerhalb der Erreger von Mucor-Mykosen konserviert ist. Das sich ergebende äußere Primerpaar ZM1: 5'-ATT ACC ATG AGC AAA TCA GA-3' und ZM 2: 5'-TCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT C-3', amplifiziert ein 407 bis 408 bp langes Fragment. ZM 1 und ZM 2 sind den Positionen 722 – 741 und 1129 -1108 der 18S rDNA von *Cunninghamella bertholletiae* (GenBank accession number AF 113421) komplementär. Bei der nested PCR wird durch ZM 1 und ZM 3: 5'-CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT AG-3' ein 176 bis 177 bp langes Fragment des ersten Produktes begrenzt. ZM 3 ist zu den Positionen 898 – 876 der 18 S rDNA von *Cunninghamella* spp. komplementär. Die Primerpositionen bei anderen Mucorales können der Abbildung 6 entnommen werden. Bei der Auswahl der Primer im Herbst 2002 wurden die vorhergesehenen Abschnitte auf Homologien zu bereits bekannten Sequenzen mittels Abgleich mit dem Suchprogramm BLAST (NCBI) untersucht. Die Primerpaare ZM 1/ ZM 2 und

ZM 1/ ZM 3 zeigten zum damaligen Zeitpunkt keine Homologien zu bekannten humanen Gensequenzen.



**Abb. 6:** Alignment der 18S rDNA Sequenzen der Zygomyceten, die vom inneren Primerset ZM1 und ZM3 amplifiziert werden, nach einem Programm von Corpet, 1988 (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multialin/multialin.html>). Die komplementären Primerregionen sind mit schwarzen Balken gekennzeichnet. Schwarze Buchstaben markieren Nukleotidpositionen mit geringer oder fehlender Übereinstimmung; rote Buchstaben zeigen eine komplette Übereinstimmung aller Sequenzen an. Spezies und GenBank accession numbers von oben nach unten: *Absidia corymbifera* (AF113407), *Rhizomucor pusillus* (AF113434), *Cokeromyces recurvatus* (AF113416), *Saksenaeeavasiformis* (AF113442), *Mucor hiemalis* (AF113428), *Rhizopus oryzae* (AF113440), *Cunninghamella bertholletiae* (AF113421), *Syncephalastrum racemosum* (X89437)

**Zygomyceten-PCR.** Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl, bestehend aus 10 µl DNA-Extrakt und 40 µl Reaktionsmix, hatte eine Endkonzentration von 10 mM Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM KCL, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (10 x Perkin Elmer Puffer II plus MgCl<sub>2</sub>-Lösung), 1 µM von jedem der Primer

ZM 1/ ZM 2, 1,5 U AmpliTaq-DNA-Polymerase und 100 µM der einzelnen Desoxynukleosidtriphosphate. Weitere Informationen zum Reaktionsmix und zum Temperaturprofil der Reaktion sind in den Tabellen 4 und 5 dargestellt. Diese und alle folgenden PCRs wurden mit dem Cycloer Primus 96 Plus durchgeführt. Nach fünfminütigem Schmelzen der DNA-Doppelstränge bei 94 °C, dem sog. Pretreatment, wurden 35 Zyklen mit den jeweiligen Reaktionsstufen Denaturierung (94 °C für 30 Sek.), Annealing der Primer (50 °C für 30 Sek.) und DNA-Synthese (72 °C für 60 Sek.) durchgeführt. Als Posttreatment bezeichnet man die abschließende, einmalige Elongation über 5 Min. bei 72 °C. Anschließend kühlte die PCR-Maschine auf 4 °C ab. Diese Temperatur wurde bis zur Probenentnahme konstant gehalten.

**Tab. 4:** Pipettierschema der Zygomyzeten-PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	28,2 µl	
10 x Puffer ( pH 8,3 )	5 µl	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	5 µl	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
ZM 1	0,5 µl	1 µM
ZM 2	0,5 µl	1 µM
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM dNTP
AmpliTaQ	0,3 µl	1,5 U
Ansatzvolumen	40 µl	
DNA-Extrakt	10 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

**Tab. 5:** Temperaturprofil der Zygomyceten- und Aspergillus-PCR-Verfahren

Pretreatment/	94 °C für 5 Min.	
DNA-Denaturierung		
Denaturierung	94 °C für 30 Sek.	35 Zyklen
Annealing	50 °C für 30 Sek.	
DNA-Synthese	72 °C für 60 Sek.	
Posttreatment/	72 °C für 5 Min.	
Elongation		

**Zygomyceten-spezifische nested PCR:** Der Reaktionsansatz der nested PCR entsprach im Wesentlichen dem der ersten PCR. Beim Reaktionsansatz wurden 37,2 µl H<sub>2</sub>O<sub>Amp</sub> verwendet und zum Ansatzvolumen der einzelnen Proben von 49 µl wurde 1 µl des ersten PCR-Produktes zugegeben. Die Details sind in Tabelle 6 dargestellt. Das Temperaturprofil entsprach dem der ersten PCR (siehe Tab. 5).

**Tab. 6:** Pipettierschema der Zygomyceten nested PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	37,2 µl	
10 x Puffer ( pH 8,3 )	5 µl	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	5 µl	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
ZM 1	0,5 µl	1 µM
ZM 3	0,5 µl	1 µM
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM dNTP
AmpliTaq	0,3 µl	1,5 U
Ansatzvolumen	49 µl	
Produkt der ersten PCR	1 µl	
Gesamtvolumen	50 µl	

### 2.3.3 Gelelektrophorese der Amplifikate

Die Amplifikate wurden in einem 1,75%igem Agarosegel aufgetrennt. Zum Herstellen eines Geles wurden in einem Erlenmeyerkolben 0,7 g Agarose und 40 ml 1x TAE-Puffer eingefüllt und bis zum vollständigen Lösen aufgeköcht. Der unter 60°C abgekühlten, noch flüssigen Agarose, wurden 3 µl Ethidiumbromid zugesetzt und die Agarose in die vorbereiteten Gelkammern, die Schablonen für die Geltaschen enthielten, gegossen. Nach mindestens 20 minütigem Auspolymerisieren wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x TAE-Puffer übergossen.

In einer Mikrotiterplatte wurden 10 µl des nested-Amplifikates mit 2 - 5 µl Ladepuffer vermischt und 10 µl des Gemisches in eine Geltasche gefüllt. Zur Fragmentlängenbestimmung wurden 5 µl des 100 bp DNA-Leiters jeweils in die erste Geltasche jeder Reihe aufgetragen. Die Laufzeit betrug bei 95 Volt ca. 40 Min.. Die Gele wurden unter UV-Licht ausgewertet und mittels digitaler Video-Fotoanlage dokumentiert.

### 2.3.4 Bestimmung der Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurde mit der nach der Miniprep entstandenen Plasmidlösung (siehe 2.3.10.4) eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Zunächst wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des Photometers gemessen. Die Verdünnungsreihe wurde über 1:10 Verdünnungen mit H<sub>2</sub>O<sub>Amp</sub> erstellt. Die Amplifikation mittels Zygomyceten- bzw. *Aspergillus*-spezifischer PCR und anschließender nested PCR wurde durchgeführt (siehe 2.3.2 und 2.3.5). Nach dem Auftragen auf das Gel wurde die Verdünnung bestimmt, bei der gerade noch eine spezifische Bande erkennbar war.

### 2.3.5 Amplifikation *Aspergillus*-spezifischer DNA

**Primerdesign.** Diese PCR wurde in Anlehnung an die Arbeit von Bretagne et al. (1995) aufgebaut. Sie dient dem Nachweis mitochondrialer *Aspergillus*-DNA.

Mit den Primern P 1: 5'- GAA AGG TCA GGT GTT CGA GTC AC-3' und P 2: 5'- CTT TGG TTG CGG GTT TAG GGA TT-3' wird ein 135 bp langes Fragment der mitochondrialen DNA von *Aspergillus* spp. amplifiziert. Die Primerpositionen entsprechen den Positionen 804 - 826 (P 1) und 938 – 916 (P 2) der Sequenz der mitochondrialen DNA von *Aspergillus fumigatus* (GenBank accession number L37095).

Zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität wurden P 1 und P 2 als nested PCR-Primer verwendet und ein zusätzlicher äußerer Primer für die erste Reaktion bestimmt, Asp 2: 5'-GGG AGT TCA AAT CTC CCT TGG G-3'. P2 und Asp 2 amplifizieren ein 201 bp langes Fragment der mitochondrialen DNA von *Aspergillus fumigatus*, zu welcher Asp 2 in den Positionen 738 – 759 komplementär ist.

**Aspergillus-PCR.** In den Reaktionsansatz der PCR wurden 40 µl Reaktionsmix zu 10 µl Proben-DNA gegeben. Der Reaktionsmix bestand, wie bei der Zygomyceten-PCR, aus einer Endkonzentration von 10 mM Tris-HCL, 50 mM KCL, 2,5 mg MgCl<sub>2</sub> (10 x Perkin Elmer Puffer II plus MgCl<sub>2</sub>-Lösung), 1 µM von jedem Primer P 2 und Asp 2 sowie 1,5 U AmpliTaq-DNA-Polymerase und 100 µM der einzelnen Desoxynukleosidtriphosphate. Das Temperaturprofil entsprach dem der Zygomyceten-PCR (siehe Tab. 5).

**Tab. 7:** Pipettierschema der Aspergillus-PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	28,2 µl	
10 x Puffer ( pH 8,3 )	5 µl	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	5 µl	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
P 2	0,5 µl	1 µM
Asp 2	0,5 µl	1 µM
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM dNTP
AmpliTaq	0,3 µl	1,5 U
Ansatzvolumen	<hr/> 40 µl	
DNA-Extrakt	10 µl	
Gesamtvolumen	<hr/> 50 µl	

**Aspergillus-spezifische nested PCR.** P 1 und P 2 amplifizieren ein 135 bp langes Produkt. Der Reaktionsmix beinhaltete Endkonzentrationen von 10 mM Tris-HCl, 50mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (10 x Perkin Elmer Puffer II plus MgCl<sub>2</sub>-Lösung), 1 µM von jedem Primer P 1/ P 2, 1,5 U AmpliTaq-DNA-Polymerase und 100 µM jedes Desoxynukleosidtriphosphat. Das Pipettierschema und das Temperaturprofil stimmten mit dem der Zygomyceten nested PCR überein (Temperaturprofil siehe Tab. 5).

**Tab. 8:** Pipettierschema der Aspergillus nested PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	37,2 µl	
10 x Puffer (pH 8,3)	5 µl	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	5 µl	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
P 1	0,5 µl	1 µM
P 2	0,5 µl	1 µM
dNTP-Mix	0,5 µl	100 µM dNTP
AmpliTaq	0,3 µl	1,5 U
Ansatzvolumen	<hr/> 49 µl	
Produkt der ersten PCR	1 µl	
Gesamtvolumen	<hr/> 50 µl	

**Tab. 9:** Übersicht der Primer der Zygomyceten- und Aspergillus-PCR

<u>Primer</u>	<u>Sequenz (5'-3')</u>	<u>GenBank(a.n.)*</u>	<u>Referenz</u>
ZM 1	ATT ACC ATG AGC AAA TCA GA	AF 113421	diese Arbeit
ZM 2	TCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT C	AF 113421	diese Arbeit
ZM 3	CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT AG	AF 113421	diese Arbeit
P 1	GAA AGG TCA GGT GTT CGA GTC AC	L37095	Bretagne et al., 1995
P 2	CTT TGG TTG CGG GTT TAG GGA TT	L37095	Bretagne et al., 1995
Asp 2	GGG AGT TCA AAT CTC CCT TGG G	L37095	diese Arbeit

\*GenBank accession number

### 2.3.6 Kontrollen

**Maßnahmen zur Qualitätssicherung und Kontaminationskontrolle.** Die Arbeitsschritte Extraktion, Reaktionsmixansatz, Probenzugabe und Gellauf wurden, entsprechend den Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (MiQ) für diagnostische PCR-Verfahren der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, räumlich getrennt und mit stationären Arbeitsgeräten (z. B. Pipettenansätze) durchgeführt.

Sämtliche, im Rahmen der Extraktion verwendete Puffer, wurden an einem Reinarbeitsplatz in kleinen Mengen (1,5-2 ml) in sterile Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Verhaltensempfehlungen zum Arbeiten an Sterilbänken wurden beachtet und es wurden ausschließlich gestopfte Pipettenspitzen verwendet. Für die Extraktion wurden kommerziell abgepackte Filterpipettenspitzen benutzt.

**Extraktionskontrollen.** Bei der Extraktion von Paraffinblöcken und Biopsien (siehe 2.3.1) wurden von Anfang an Kontrollen mitgeführt. Diese Eppendorfgefäße hatten die gleiche Größe und beinhalteten statt Paraffinschnitten oder Biopsien 200 µl sterile 0,9%ige Natriumchloridlösung. Die Kontrollen waren nach dem ersten Reaktionsschritt nicht von den anderen Proben zu unterscheiden und nahmen wie diese an jedem Reaktionsschritt und an jeder Inkubation teil. Sie wurden in der PCR und folgenden nested PCR mit anschließender Gelelektrophorese zur Kontrolle von Kontaminationen mitgeführt.

**PCR und nested PCR.** Die folgenden Kontrollen wurden bei jeder PCR angesetzt und wie die anderen Proben behandelt (siehe 2.3.2 und 2.3.5). Die PCR-Produkte der Kontrollen wurden ebenfalls im Gel aufgetrennt (siehe 2.3.3).

Positivkontrolle

Klonierte Plasmid-DNA von *Absidia corymbifera* und *Aspergillus fumigatus* (siehe 2.3.10) wurden als Positivkontrollen eingesetzt. Zum Reaktionsansatz

wurden 10 µl der klonierten DNA anstelle von Proben-DNA gegeben. Die Positivkontrolle diente zum Beweis einer erfolgreichen PCR-Amplifikation und zeigte im Gelbild die erwartete Fragmentgröße, anhand derer andere Amplifikate beurteilt werden konnten.

#### Negativkontrolle

Als Negativkontrolle wurden 10 µl aus humanen Leukozyten extrahierte DNA eingesetzt. Dies diente der Kontrolle unspezifischer Bindungen der Primer und damit unspezifischer Amplifikationen von humaner DNA.

#### Leerwert

Der Leerwert wurde zur Kontrolle des Reaktionsansatzes und als Kontaminationskontrolle benötigt. 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>Amp</sub> wurden zum Reaktionsansatz gegeben und mitgeführt. Der Reaktionsansatz der nested PCR wurde ebenfalls mit einem nested-Leerwert überprüft. Hier wurde 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>Amp</sub> anstelle von 1 µl des ersten PCR-Produktes dazugegeben.

#### Inhibitorkontrolle

Zum Ausschluss von PCR-Inhibitoren als Ursache eines negativen PCR-Ergebnisses wurden bei jeder negativen Probe in einem zweiten PCR-Ansatz 8 µl Proben-DNA mit 2 µl der Positivkontrolle vermischt. Beim Nachweis eines Amplifikates konnten Inhibitoren ausgeschlossen werden.

**Nachweis erfolgreicher DNA-Extraktion.** Bei fehlendem Amplifikat nach der Zygomyceten- und Aspergillus- nested PCR wurde eine Überprüfung der DNA-Extraktion erforderlich. Dazu wurde eine GAPDH-PCR mit folgender nested GAPDH-PCR (zum Nachweis des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gens) oder eine β-Globin-PCR (zum Nachweis des β-Globin-Gens) durchgeführt. Der Nachweis der Zielsequenz in einem der beiden Gene bestätigte eine erfolgreiche Extraktion amplifizierbarer DNA, da beide Gene spezifisch für humane DNA sind. Dabei hatte die GAPDH-PCR durch die folgende nested PCR eine erhöhte Sensitivität und wurde vor allem zur

Bestätigung geringer Mengen humaner DNA verwendet, z.B. bei Paraffin eingebetteten Gewebeproben.

Bei positivem Ergebnis der GAPDH- oder  $\beta$ -Globin-PCR wurde der DNA-Extrakt auf ca. 50  $\mu$ l eingengt und somit die DNA-Konzentration erhöht. Die PCR und nested PCR wurden wiederholt. Bei negativer GAPDH- bzw.  $\beta$ -Globin-PCR wurde die Extraktion bei vorhandenem Material wiederholt.

**$\beta$ -Globin-PCR.** Für diese PCR wurden die Primer G1: 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3' und G2: 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' verwendet. Die Primer entsprechen den Positionen 70400 – 70419 bzw. 70667 – 70648 der auf dem Chromosom 11 des Homo sapiens liegenden  $\beta$ -Globin-Region (GenBank accession number NG\_000007). Das entstehende Fragment ist 268 bp lang. Der Reaktionsmix setzte sich aus 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> (10 x Perkin Elmer Puffer II plus MgCl<sub>2</sub>-Lsg.), 2  $\mu$ M von jedem Primer G 1/2, 1,5 U AmpliTaq-DNA-Polymerase und 100  $\mu$ M von jedem Desoxynukleosidtriphosphat zusammen. Zu 45  $\mu$ l Reaktionsmix wurden 5  $\mu$ l Proben-DNA gegeben. Das Temperaturprofil entsprach dem der Zygomyceten- und Aspergillus-PCR, außer dass die DNA-Synthese Zeit auf 45 Sekunden verkürzt war (siehe Tab. 11).

**Tab. 10:** Pipettierschema der  $\beta$ -Globin-PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	31,2 $\mu$ l	
10 x Puffer (pH 8,3)	5 $\mu$ l	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	6 $\mu$ l	3 mM MgCl <sub>2</sub>
G 1	1 $\mu$ l	2 $\mu$ M
G 2	1 $\mu$ l	2 $\mu$ M
dNTP-Mix	0,5 $\mu$ l	100 $\mu$ M dNTP
AmpliTaq	0,3 $\mu$ l	1,5 U
Ansatzvolumen	45 $\mu$ l	
DNA-Extrakt	5 $\mu$ l	
Gesamtvolumen	50 $\mu$ l	

**Tab. 11:** Temperaturprofil der  $\beta$ -Globin-PCR

Pretreatment/ DNA-Denaturierung	94 °C für 5 Min.	
Denaturierung	94 °C für 30 Sek.	35 Zyklen
Annealing	50 °C für 30 Sek.	
DNA-Synthese	72 °C für 45 Sek.	
Posttreatment/ Elongation	72 °C für 5 Min.	

**GAPDH-PCR:** Für diese PCR wurden die Primer GAP 1: 5'-GAC AAC AGC CTC AAG ATC ATC-3' und GAP 2: 5'-GAC GGC AGG TCA GGT CCA CCA-3' verwendet (Bialek et al., 2003). Die Primer sind komplementär zu den Positionen 3816 – 3836 und 4425 – 4405 humaner DNA (GenBank accession number J04038.1) und amplifizieren ein 610 bp langes Fragment. Der Reaktionsmix bestand aus 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (10 x Perkin Elmer Puffer II plus MgCl<sub>2</sub>-Lsg.), 1  $\mu$ M von jedem Primer Gap 1/2, 1,5 U

AmpliTaq-DNA-Polymerase und 200  $\mu\text{M}$  von jedem Desoxynukleosidtriphosphat. 40  $\mu\text{l}$  Reaktionsmix fugte man 10  $\mu\text{l}$  DNA-Extrakt zu. Das Temperaturprofil entsprach dem der  $\beta$ -Globin-PCR, außer dass die Annealing-Temperatur 56  $^\circ\text{C}$  (siehe Tab. 13) betrug.

**Tab. 12:** Pipettierschema der GAPDH-PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	27,7 $\mu\text{l}$	
10 x Puffer (pH 8,3)	5 $\mu\text{l}$	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	5 $\mu\text{l}$	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Gap 1	0,5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
Gap 2	0,5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{M}$
dNTP-Mix	1 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{M}$ dNTP
AmpliTaq	0,3 $\mu\text{l}$	1,5 U
Ansatzvolumen	40 $\mu\text{l}$	
DNA-Extrakt	10 $\mu\text{l}$	
Gesamtvolumen	50 $\mu\text{l}$	

**Tab. 13:** Temperaturprofil der GAPDH-PCR

Pretreatment/	94 $^\circ\text{C}$ fur 5 Min.	
DNA-Denaturierung		
Denaturierung	94 $^\circ\text{C}$ fur 30 Sek.	35 Zyklen
Annealing	56 $^\circ\text{C}$ fur 30 Sek.	
DNA-Synthese	72 $^\circ\text{C}$ fur 45 Sek.	
Posttreatment/	72 $^\circ\text{C}$ fur 5 Min.	
Elongation		

**GAPDH-nested PCR.** Für die nested PCR wurden GAP 3: 5'-AAT GCC TCC TGC ACC ACC-3' und GAP 4: 5'-ATG CCA GTG AGC TTC CCG-3' verwendet (Bialek et al., 2003). Diese Primer sind zu den Positionen 3932 – 3949 sowie 4372 – 4355 der humanen DNA komplementär und amplifizieren ein 441 bp langes Fragment. Bei der nested PCR ergaben 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (10 x Perkin Elmer Puffer II plus MgCl<sub>2</sub>-Lsg.), 1 µM von jedem Primer GAP 3/4, 1,5 U AmpliTaq-DNA-Polymerase und 200 µM von jedem Desoxynukleosidtriphosphat den Reaktionsmix, zu dem 2 µl der ersten PCR zu einem Gesamtvolumen von 50 µl zugegeben wurden. Das Temperaturprofil entsprach dem der ersten PCR (siehe Tab. 13).

**Tab. 14:** Pipettierschema der GAPDH-nested PCR

<u>Reagenzien</u>	<u>Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	35,7 µl	
10 x Puffer (pH 8,3)	5 µl	10 mM Tris-HCl 50 mM KCl
MgCl <sub>2</sub> -Lsg.	5 µl	2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Gap 3	0,5 µl	1 µM
Gap 4	0,5 µl	1 µM
dNTP-Mix	1 µl	200 µM dNTP
AmpliTaQ	0,3 µl	1,5 U
Ansatzvolumen	<hr/> 48 µl	
Produkt der vorherigen PCR	2 µl	
Gesamtvolumen	<hr/> 50 µl	

**Tab. 15:** PCR-Primer zum Nachweis humaner DNA

<u>Primer</u>	<u>Sequenz (5'-3' Richtung)</u>	<u>GenBank(a.n.)*</u>
G 1	GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC	NG_000007
G 2	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	NG_000007
GAP 1	GAC AAC AGC CTC AAG ATC ATC	J04038.1
GAP 2	GAC GGC AGG TCA GGT CCA CCA	J04038.1
GAP 3	AAT GCC TCC TGC ACC ACC	J04038.1
GAP 4	ATG CCA GTG AGC TTC CCG	J04038.1

\*GenBank accession number

### 2.3.7 Multiplex-Verfahren

Zur Optimierung der Routinediagnostik wurde versucht eine Multiplex-PCR aufzubauen. In Anbetracht der identischen Temperaturprogramme (siehe 2.3.2, Tab. 5) und Pipettierschemata (siehe Tab. 4 und 7) bot sich eine Kombination der Zygomyceten- und Aspergillus-PCR in einem Ansatz an. Durch die Zygomycetenprimer wurde ein 176 bis 177 bp langes Fragment amplifiziert, während durch die Aspergillusprimer ein 135 bp langes Fragment entstand. Die jeweiligen Amplifikate ergaben im Gel voneinander differenzierbare Banden.

Für die Erprobung dieser PCR wurden DNA-Extrakte verwendet, die in den einzelnen PCRs eindeutige Banden ergeben hatten und mittels Sequenzierung (siehe 2.3.8) identifiziert worden waren. Der Reaktionsansatz mit dem AmpliTaq<sup>®</sup>-DNA-Kit von Perkin Elmer bestand aus:

H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	26,2 µl
10 x Puffer	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	5,0 µl
Primer 1 (P 2 / ZM 1) je	1,0 µl
Primer 2 (Asp 2 / ZM 2) je	1,0 µl
dNTP	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
	-----
Gesamtvolumen	40 µl

Zu 40 µl Reaktionsansatz wurden 10 µl Proben-DNA pipettiert.

**Nested Multiplex-PCR:** Auch für diese nested PCR wurde das AmpliTaq®-DNA-Kit von Perkin Elmer verwendet. Zu jeweils 49 µl Reaktionsansatz wurde 1 µl des vorherigen PCR-Produktes gegeben. Der Reaktionsansatz bestand aus:

H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	36,2 µl
10 x Puffer	5,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	5,0 µl
Primer 1 (P 1 / ZM 1) je	0,5 µl
Primer 2 (P 2 / ZM 3) je	0,5 µl
dNTP	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,3 µl
	-----
Gesamtvolumen	49 µl

Durch Veränderungen der Primerkonzentrationen und der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration wurde versucht die Sensitivität der einzelnen PCR-Verfahren zu erzielen.

### 2.3.8 Aufreinigung und Sequenzierung der Amplifikate

**Aufreinigung der Amplifikate mittels QIAquick®.** Die Produkte der nested PCR wurden mittels QIAquick® PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zum nested PCR-Produkt wurde das fünffache Volumen PB-Puffer gegeben und nach kurzem Mischen auf die QIAquick-Säulen mit Auffangbehälter aufgetragen. Um die DNA an die Säulenmembran zu binden wurde bei 13.000 rpm für 1 Min. zentrifugiert. Nach dem Ausleeren des Auffanggefäßes wurden 0,75 ml PE-Puffer zum Waschen zugegeben und bei 13.000 rpm für 1 Min. zentrifugiert. Der Zentrifugiervorgang wurde nach Entleeren des Eluats wiederholt. Die Säulen wurden in autoklavierte 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben. Zum Eluieren der DNA wurden 30 µl EB-Puffer auf die Säulenmembran gegeben und 1 Min. bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 Min. erhielt man die DNA gelöst und

gereinigt im Eluat. Die gereinigten Eluate wurden auf ein herkömmliches 1,75%iges Agarosegel aufgetragen (siehe 2.3.3).

**PCR zur Sequenzierung der Produkte.** Die Cycle-Sequenzreaktion (Cycle Sequencing) wurde mit dem ABI PRISM<sup>®</sup> Big Dye<sup>®</sup> Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) durchgeführt. Bei dieser Methode handelte es sich um die weiterentwickelte Form der Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977).

In der Markierungs-PCR wurden die Amplifikate durch die im Kit enthaltenen fluoreszenzmarkierten 2',3'Didesoxynukleosid-5'Triphosphate (von PE als Dye Terminatoren bezeichnet) markiert. Wie bei der klassischen Sanger-Coulson-Methode führte der zufällige Einbau dieser fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide in der Elongationsphase zum Kettenabbruch.

Für die Markierungs-PCR wurden in jedes Reaktionsgefäß 4-8µl (angestrebte Konzentration ca. 90 ng) des nested PCR-Produkts, 3 µl Primer (20 pmol/µl) und 4 µl Big Dye gegeben und mit H<sub>2</sub>O<sub>Amp</sub> auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Das Volumen des PCR-Produktes wurde anhand der Intensität der Bandenfärbung im Gel abgeschätzt und damit negativ korreliert, d. h. je geringer die Färbung desto mehr Volumen wurde verwendet.

Pipettierschema:

Big Dye	4 µl
Primer (20pmol/µl)	3 µl
Proben-DNA	X µl (je nach Bandenintensität)
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	13 – X µl

Temperaturprofil:

Für den ganzen Lauf wurde der Deckel auf 110°C aufgeheizt.

Annealing	96 °C	30 Sek.	} 25 Zyklen
Synthese	50 °C	15 Sek.	
Schmelzen	60 °C	4 Min.	

**Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Centri-Sep-Säulen.** Zur anschließenden Eliminierung von überschüssigen Dye-Terminatoren wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe von Centri-Sep<sup>®</sup>Zentrifugationssäulen gereinigt. Zur Vorbereitung der Säulen wurde jede Säule mit 800µl LiChrosolv beladen und kurz gevortext. Zur Bildung des Gels wurden die Säulen mindestens 30 Min. stehen gelassen. Nun wurde zuerst die obere, dann die untere Verschlusskappe entfernt und die Säulen einige Minuten in Sammelgefäßen stehen gelassen. Es sollten ca. 250 µl H<sub>2</sub>O<sub>Amp</sub> herauslaufen, ansonsten wurde mit einem Gummisauger nachgeholfen. Die Säulen wurden 2 Min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Die gesamten 20 µl des PCR-Produktes vom Cycle Sequencing wurden auf die Mitte der Säule aufgetragen. Nun wurde die Säule in ein Eppendorfgefäß überführt und nochmals zentrifugiert. Die Proben wurden bis zum Auftragen auf das Sequenziergel bei -20°C gelagert.

**Sequenzanalyse.** Für den Sequenzierungslauf wurden 4 µl der Probe mit 16 µl Formamid versetzt. Mit der Data Collecting Software 3100 (Applied Biosystems, Darmstadt) wurden die Daten ausgewertet.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden unter der Verwendung des Suchprogrammes BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) mit den Daten von GenBank (National Center of Biotechnology Information; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) verglichen. Nur bei einer 100%igen Übereinstimmung der DNA-Sequenz mit einer Sequenz der Datenbank wurde das PCR-Ergebnis als positiv gewertet. Andernfalls, regelhaft bei Homologien von < 95%, wurde das PCR-Produkt als eine unspezifische Amplifikation auf Grund von ubiquitär vorkommenden Pilzsporen angegeben und die PCR, wie Reaktionen ohne Amplifikate, als negativ bewertet.

### **2.3.9 Fragmentextraktion aus dem Agarosegel**

Bei unspezifischem Sequenzierergebnis und der Darstellung mehrerer Banden im Gellauf, wobei eine der Banden auf der entweder für Aspergillus- oder Zygomyceten-spezifischen Höhe lag, wurde eine Fragmentextraktion

erforderlich. Hierfür wurde ein 1,75%iges Agarosegel (siehe 2.3.3) mit großen Gelkammern gegossen. 40 µl DNA der Probe wurden mit 14 µl Ladepuffer vermischt und in eine Gelkammer pipettiert. Die Laufzeit betrug bei 95 V ca. 40 Min.. Die spezifischen Banden wurden mit einem scharfen Skalpell unter UV-Beleuchtung aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend den Herstellerangaben (Protokoll 03/2001) extrahiert. Dabei band die DNA an eine spezielle Silika-Membran, während Kontaminationen ausgewaschen wurden. Mit 35 µl Elution Puffer wurde anschließend die gereinigte DNA eluiert. Die isolierte DNA konnte direkt sequenziert werden (siehe 2.3.8).

### **2.3.10 Klonierung**

Die Klonierung bestand aus Ligation, Transformation, Ausplattieren und Picken, Plasmid-mini-prep, Kolonie-PCR und dem Cycle Sequencing. Für diese Vorgänge wurde der TOPO TA Cloning Kit for Sequencing der Firma Invitrogen verwendet. Das Produkt der ersten PCR mit DNA von *Absidia corymbifera* und *Aspergillus fumigatus* wurde kloniert. Die klonierte Plasmid-DNA wurde als Positivkontrolle eingesetzt (siehe 2.3.6).

LB-Agar wurde zum Herstellen der Agarplatten in der Mikrowelle bei 600 W zum Schmelzen gebracht. Nach Abkühlen des gelösten Agar auf Handtemperatur wurden unter der LaminarFlow 50-100 µg/ml Ampicillin zugefügt. Die Platten wurden mit ca. 25 ml Agarlösung gefüllt und verfestigten sich innerhalb einer halben Stunde bei RT. Zur Vermeidung des Abtropfens des entstehenden Kondenswassers auf die Agarfläche wurden die Platten mit ihrem Deckel nach unten gelagert. Vor dem Ausplattieren wurden die Platten mindestens drei Stunden im Brutschrank auf 37°C erwärmt.

Alle folgenden Pipettierschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

### 2.3.10.1 Ligation

Beim Ligationvorgang wurde das amplifizierte PCR-Produkt in einen Plasmid-Vektor integriert. Durch die Unterbrechung des letalen *E. coli* Gens *ccdB* durch den Einbau des PCR-Produkts wurden Klone mit dem gewünschten PCR-Produkt selektiert. Zellen, die den nicht rekombinanten Vektor enthielten, können durch die Expression des *lacZ-ccdB* Gens nicht wachsen.

Zur Ligation wurde ein 6 µl Ansatz in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß hergestellt.

Dieser bestand aus:

PCR-Produkt	2 µl
Salt Solution	1 µl
TOPO-Vektor	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	2 µl

Der Reaktionsansatz wurde auf Eis hergestellt. Durch Anschneiden des Eppendorfgefäßes wurde der Ansatz vermischt. Dann folgte die Inkubation bei RT für exakt 5 Min. und anschließend wurde der Ansatz wieder auf Eis gestellt. Das Ligationsprodukt konnte bei – 20°C für ca. 1 – 2 Wochen gelagert werden.

### 2.3.10.2 Transformation

Die Ligationsprodukte wurden bei der Transformation in chemokompetente *E. coli* Bakterien überführt. Für jeden Ligationansatz wurde ein Gefäß mit Bakterien benötigt. Diese wurden bei – 80°C gelagert und nun auf Eis 10 Min. aufgetaut. Nach der Zugabe von 2 µl des jeweiligen Ligationproduktes wurde der Ansatz durch leichtes Anschneiden der Gefäße vermischt. Nach Inkubation für 15 – 20 Min. auf Eis wurde der Ansatz zur chemischen Transformation in den folgenden 30 Sek. im 42°C heißen Wasserbad hitzeschock behandelt. Danach wurde das Gefäß wieder auf Eis gegeben. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Wachstumsmedium wurde der Ansatz für 60 Min. bei 200 rpm und 37°C

im Thermoschüttler inkubiert. Anschließend wurde das Gefäß wieder auf Eis gestellt.

### **2.3.10.3 Ausplattieren und Picken**

Die Bakterien wurden mittels Glaskugeln auf den vorgewärmten Agarplatten ausplattiert. Pro Ansatz wurden zwei Platten mit je 100 und 150 µl Bakteriensuspension beladen. Die Kolonien wuchsen über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank.

Dem LB-Medium wurden 50 – 100 µg/ml Ampicillin zugegeben. Circa 3 ml des LB-Mediums wurden in die im Kit enthaltenen RedCups gegeben. Drei große einzelstehende Kolonien wurden auf den Unterdeckeln jeder Platte markiert. Zum Picken der markierten Kolonien unter der LaminarFlow wurden autoklavierte Holzstäbchen, die vor dem Picken noch einmal kurz durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen wurden, verwendet. Die Holzstäbchen wurden in die RedCups gegeben. Die angeimpften Medien wurden über Nacht mit aufgedrehtem Deckel im Schüttler bei 37°C inkubiert.

### **2.3.10.4 Plasmid-Miniprep**

Aus dem trüben LB-Medium wurden die Holzstäbchen, möglichst ohne Berührung der Innenfläche der Cups, herausgeholt. Dies geschah durch Schräghalten der Cups im Winkel von 45° zur Horizontalen und Klopfen auf den Unterrand der Cups. Es wurden 425 µl der Bakteriensuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und 75 µl autoklaviertes Glycerin zugegeben. Gut geschüttelt konnte die Dauerkultur bei – 80°C eingefroren werden.

Die restliche LB-Zellkultur wurde in den RedCups 10 Min. bei 4400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer P1, der im Kit enthalten war, vollständig resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben. Vom Lysispuffer P2 wurden 250 µl zugegeben und der Ansatz durch mehrmaliges Kippen der Gefäße vorsichtig

durchmischt. Nach max. 5 Min. wurden 350 µl des Puffers N3 zugeführt und damit die Lysisreaktion beendet. Der Ansatz wurde wieder durch mehrmaliges Kippen gemischt. Die Gefäße wurden bei 13.000 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand konnte abgenommen und auf die im Kit enthaltenen Säulen mit Auffangröhrchen gegeben werden. Diese wurden für 90 Sek. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und nach der Zugabe von 500 µl PB Puffer wurde der Zentrifugiervorgang wiederholt. Das Eluat wurde wieder verworfen. 750 µl PE Puffer wurden zugefügt und bei 13.000 rpm für 90 Sek. zentrifugiert. Um das im PE-Puffer enthaltene Ethanol vollständig zu entfernen, wurde die Zentrifugation bei gleicher Dauer und Geschwindigkeit wiederholt. Die Säulen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und es wurde durch Auftragen auf die jeweilige Säule mit 50 µl LiChrosolv eluiert. Nach der Inkubation von 1 Min. bei RT wurde mit 13.000 rpm für 90 Sek. zentrifugiert. Die Säule konnte nun entfernt und das Eluat bei 4°C oder gegebenenfalls bei -20°C gelagert werden.

### 2.3.10.5 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente dem Nachweis einer erfolgreichen Klonierung. Die mittels Miniprep extrahierte DNA wurde in dieser PCR amplifiziert. Der 20 µl Ansatz bestand aus:

<u>Komponente</u>	<u>Eingesetzte Volumina</u>	<u>Endkonzentrationen</u>
dNTP-Mix (mM)	0,2 µl	100 µM
10 x Puffer	2,0 µl	1x
Primer T 3 (20 pmol/µl)	0,4 µl	0,4 µM
Primer T 7 (20 pmol/µl)	0,4 µl	0,4 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	1 U
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	15,8 µl	
Plasmid-DNA	1,0 µl	

Diese PCR wurde mit dem Thermocycler von Hybaid durchgeführt.

Temperaturprofil:

94 °C	1 Min.	}	25 Zyklen
55 °C	1 Min.		
72 °C	1 Min.		
72 °C	10 Min.		einmalig

Mit der folgenden Gelelektrophorese wurde der Nachweis von DNA in den Ansätzen geführt und die Größe bzw. Basenpaarlänge bestimmt.

### 2.3.10.6 Cycle Sequencing

Dieses Cycle Sequencing entsprach im Wesentlichen dem zuvor Beschriebenen (siehe 2.3.8). Die einzelsträngige DNA wurde mit einem Sequenzierprimer, der spezifisch für den Plasmidvektor ist (T3 oder T7), amplifiziert. Bei Fragmenten bis 400 bp war ein Reaktionsansatz mit dem reversen Primer (T 7) ausreichend. Bei einer Basenlänge von über 400 bp wurde zusätzlich ein Reaktionsansatz mit dem Vorwärtsprimer (T3) durchgeführt. Bei dieser Sequenzierung wurden die Primer in einer Konzentration von 10 pmol/ml eingesetzt und der Thermocycler von Hybaid verwendet.

Pipettieransatz:

Big Dye	4,0 µl
Primer	0,5 µl
Plasmid-DNA	5,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Amp</sub>	12,5 µl

#### Temperaturprofil:

96 °C	30 Sek.	}	30 Zyklen
50 °C	15 Sek.		
60 °C	4 Min.		

Die Proben wurden anschließend über Centri-sep-Säulen (siehe 2.3.8) aufgereinigt und die Basenfolge mittels Sequenzierung bestimmt (siehe 2.3.8).

## **2.4 Statistik**

Für die Berechnung der Sensitivität und Spezifität der PCR-Verfahren ist die Kenntnis der „richtigen“ Diagnose erforderlich. Da die Diagnose der verschiedenen Pilzinfektionen in den Gewebeproben aber mehrheitlich nur histologisch gestellt wurde, kann weder eine Verwechslung noch die Anwesenheit mehrerer Pilzarten diagnostiziert, respektive sicher ausgeschlossen werden. Die „Wahrheit“ ist bei fehlenden Kulturergebnissen somit nicht definierbar, so dass „richtig“ und „falsch“ positiv bzw. negativ für die PCR-Ergebnisse nicht eindeutig bestimmt werden können.

Die Sensitivität der PCR-Verfahren wurde als der Prozentsatz berechnet, der mittels PCR nachgewiesenen Pilzinfektionen in Bezug auf alle histologisch diagnostizierten Pilzinfektionen.

Als Spezifität der PCR-Verfahren wurde die Anzahl der Proben definiert, die bei histologischer Diagnose einer Aspergillose in der PCR eine Zygomycose und vice versa ergaben, also „falsch positiv“ in Bezug auf die histologische Diagnose anzusetzen sind.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 PCR-Ergebnisse der Paraffin eingebetteten Gewebeproben

**Zygomysen.** In 16 der 27 histologisch ausschließlich als Zygomysen diagnostizierten Proben konnte mittels Zygomysen-PCR spezifische DNA amplifiziert werden (59,3%). Die Amplifikate von 176 bis 178 Basenpaaren zeigten in neun Fällen eine komplette Identität zu *Rhizomucor* spp., in jeweils zwei Proben zu *Cunninghamella* spp., *Mucor hiemalis* und *Absidia corymbifera* und in einem Fall zu *Rhizopus oryzae*. In nur einer dieser Proben wurde zusätzlich *Aspergillus*-spezifische DNA mittels PCR amplifiziert, während alle anderen 15 Proben eine negative *Aspergillus*-PCR aufwiesen.

Aus den Extrakten von vier weiteren Proben konnte mittels Zygomysen-PCR DNA amplifiziert werden, die in der Gelelektrophorese eine Bande von der zu erwartenden Basenlänge von etwa 177 bp ergab. Die Sequenzierung zeigte jedoch, dass es sich um Produkte mit Homologien zu humaner DNA oder zur 18S rDNA von Basidiomyzeten handelte, so dass keine Zygomysen-spezifische 18S rDNA amplifiziert worden war. Da in keinem Fall eine eindeutige Zuordnung zu einem Pilz oder zu einem humanen Gen möglich war, wurde eine am ehesten unspezifische Amplifikation angenommen.

Im Gegensatz zur histologischen Diagnose einer Zygomysen konnte bei fünf Proben keine Zygomysen-spezifische DNA vervielfältigt werden. Bei zwei weiteren Proben konnte ausschließlich *Aspergillus*-spezifische DNA mit der entsprechenden PCR amplifiziert werden.

**Aspergillosen.** Ein Amplifikat von etwa 135 Basenpaaren konnte mit der DNA von zwölf der 18 als Aspergillose diagnostizierten Gewebeproben im Agarosegel dargestellt werden (66,67%). Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab eine komplette Übereinstimmung mit der in GenBank deponierten Sequenz der mitochondrialen DNA von *Aspergillus fumigatus*. Die korrespondierende Zygomysen-PCR ergab in nur einer der zwölf Proben ein

Amplifikat. Bei fehlender Übereinstimmung mit einer Sequenz in GenBank handelte es sich um eine unspezifische Amplifikation.

Aus den DNA-Extrakten der übrigen sechs, als Aspergillose diagnostizierten Proben, konnte weder Aspergillus- noch Zygomyceten-spezifische DNA amplifiziert werden. Nur eine dieser Proben wies ein Amplifikat erwarteter Länge nach der Zygomyceten-PCR im Agarosegel auf, dessen Sequenz es jedoch als unspezifische Amplifikation identifizierte.

**Tab. 16:** PCR-Ergebnisse der Paraffin eingebetteten Proben mit histologischer und/oder kultureller Diagnose einer Zygomycose (n=27) oder Aspergillose (n=18)

Histologie	Asp. PCR positiv	Zygomyceten PCR		kein Ampli- fikat
		PCR-Produkt	Identifizierung anhand Sequenzierung <sup>†</sup>	
Aspergillose 18	12	2	-	4
Zygomycosen 27	3*	20*	16	5

Asp. = Aspergillus

\* in einer Probe Nachweis von *A. fumigatus* und *Rhizomucor* spp.

† PCR-Produkte der Zygomyceten-PCR wurden anhand der Sequenzen identifiziert – bei fehlender Übereinstimmung mit der Zygomyceten 18S rDNA Sequenz und Nachweis von Homologien zu diversen Basidiomyceten oder humaner DNA wurde von einer unspezifischen Amplifikation ausgegangen und das PCR-Ergebnis als negativ gewertet.

**Mischinfektionen.** In sechs Fällen wurde histologisch und/oder kulturell eine Infektion sowohl mit Aspergillen als auch mit Zygomyceten diagnostiziert. Nur bei zwei davon konnte sowohl mit der Aspergillus- als auch mit der Zygomyceten-PCR DNA amplifiziert werden, die in der Sequenzierung als *A. fumigatus* und *Cunninghamella* spp. bzw. *Rhizomucor* spp. identifiziert wurde. In weiteren zwei Fällen blieb die Aspergillus-PCR negativ während mittels Zygomyceten-PCR DNA amplifiziert werden konnte, die anhand der

Sequenzierung in beiden Fällen als *Rhizomucor* spp. identifiziert wurde (100% Identität mit der Teilsequenz der in der Datenbank deponierten 18S rDNA).

Bei den letzten zwei Proben konnte spezifische DNA weder mittels Zygomyceten- noch mit der Aspergillus-PCR amplifiziert werden. Das in einem Fall nachweisbare Produkt der Zygomyceten-PCR stellte sich in der Sequenzierung als eine unspezifische Amplifikation heraus.

In zwei weiteren Gewebeproben war histologisch eine Infektion mit *Mucor* und *Candida* spp. diagnostiziert worden. Aus beiden Proben wurde *Cunninghamella* spp. angezüchtet. Passend dazu konnte mit der Zygomyceten-PCR in beiden Fällen DNA amplifiziert werden, die anhand der Sequenzierung als *Cunninghamella* spp. spezifisch identifiziert werden konnte. In einem Fall wurde zusätzlich *Aspergillus fumigatus*-spezifische DNA mittels PCR und Sequenzierung detektiert, während die andere Probe kein Amplifikat in der Aspergillus-PCR aufwies.

**Tab. 17:** PCR-Ergebnisse der Paraffin eingebetteten Proben mit histologischer und/oder kultureller Diagnose einer Mischinfektion

Histologie	Asp. PCR positiv	Zygomyceten PCR		kein Ampli- fikat
		PCR-Produkt	Identifizierung anhand Sequenzierung†	
Aspergillose und Zygomycose, n=6	2*	5*	4	1
Zygomycose und Candidose, n=2	1 <sup>L</sup>	2 <sup>L</sup>	2	-

Asp. = Aspergillus

\* in 2 Proben Nachweis von sowohl *A. fumigatus* als auch *Rhizomucor* spp. bzw. *Cunninghamella* spp.

<sup>L</sup> in einer Probe Nachweis von *A. fumigatus* und *Cunninghamella* spp.

† PCR-Produkte der Zygomyceten-PCR wurden anhand der Sequenzen identifiziert – bei fehlender Übereinstimmung mit der Zygomyceten 18S rDNA Sequenz und Nachweis von Homologien zu diversen Basidiomyzeten oder humaner DNA wurde von einer unspezifischen Amplifikation ausgegangen und das PCR-Ergebnis als negativ gewertet.

**Nicht näher spezifizierte Pilzinfektionen.** Histologisch wurde eine Probe als Myzetom diagnostiziert, bestehend aus mindestens zwei verschiedenen Pilzarten, die weder Hefepilzen noch Zygomyceten oder Aspergillen zugeordnet wurden. Mittels Aspergillus-PCR wurde eine Mischinfektion von *Aspergillus fumigatus* und *A. nidulans* nachgewiesen, während die Zygomyceten-PCR negativ blieb.

Aus einer Probe mit der histologischen Diagnose „Pilzpneumonie“ konnte mittels PCR und Sequenzierung DNA sowohl von *Aspergillus fumigatus* als auch von *Cunninghamella* spp. amplifiziert werden.

Aus der DNA einer Probe, die histologisch als vereinbar mit invasiver Mykose befundet worden war, konnte weder Zygomyceten- noch *Aspergillus*-spezifische DNA mit den PCR-Verfahren amplifiziert werden.

**Mykose-verdächtige Proben.** Zehn Proben wurden von Patienten mit ausschließlich klinischem und/oder radiologischem Verdacht auf eine invasive Pilzinfektion mittels PCR untersucht. In drei Proben wurde pilzspezifische DNA mit der PCR detektiert: in einem Fall ausschließlich *A. fumigatus*, in einem weiteren *Absidia corymbifera* und in einer Probe wurde sowohl *A. fumigatus*- als auch *Rhizopus oryzae*-DNA nachgewiesen. Aus vier Proben konnte keine spezifische DNA amplifiziert werden. In drei Fällen wurde keine DNA nachgewiesen und das Amplifikat der vierten Probe der Zygomyceten-PCR erwies sich in der Sequenzierung als unspezifisch.

In einer Patientenprobe, bei der zunächst eine Infektion mit *Pseudallescheria* spp. vermutet wurde, blieben die Histologie und die Kultur negativ. Korrespondierend dazu konnte weder mit der Aspergillus- noch mit der Zygomyceten-PCR DNA amplifiziert werden.

Eine Probe stammte von einem Patienten mit Verdacht auf eine invasive Mykose, in dessen bronchoalveolären Lavage (BAL) war *Aspergillus*-spezifische DNA in einem auswärtigen Labor mittels PCR nachgewiesen worden. Aber korrespondierend zur negativen Histologie konnte aus dem Lungengewebe mit der hier verwendeten PCR keine *Aspergillus*-spezifische DNA amplifiziert werden. Auch die Zygomyceten-PCR blieb negativ.

In einer Probe mit histologischem und kulturellem Nachweis von *Cryptococcus neoformans* ergab sich in der Aspergillus-PCR kein Amplifikat. Die Sequenz des mittels Zygomyceten-PCR amplifizierten DNA-Produktes war nicht einer definierten 18S rDNA zuzuordnen, so dass die PCR als negativ bewertet wurde.

### 3.2 PCR-Ergebnisse nativer Biopsien

Es wurden insgesamt elf native Gewebebiopsien mit beiden PCR-Verfahren untersucht. In nur zwei Proben wurde *A. fumigatus*-spezifische DNA amplifiziert. Korrespondierend dazu wurde aus den Proben *A. fumigatus* angezüchtet und histologisch eine Aspergillose diagnostiziert. In zwei postmortal entnommenen Lungenproben wurde *Absidia corymbifera*-spezifische DNA mittels Zygomyceten-PCR nachgewiesen, passend zur histologischen Diagnose. Die Kulturen blieben jedoch steril. Aus den übrigen sieben Biopsien konnte weder mit der Aspergillus- noch mit der Zygomyceten-PCR DNA amplifiziert werden. Damit übereinstimmend wurde weder mit der Kultur noch histologisch eine Pilzinfektion nachgewiesen. In allen Fällen lagen die PCR-Ergebnisse zeitlich vor den Ergebnissen von Kultur und Histologie vor.

Die Proben wurden verblindet ohne weitere Patientenangaben oder -daten untersucht. Die Rückmeldung der Daten an die Einsender zeigte dann, dass insgesamt vier Paraffinblöcke von nur zwei Patienten stammten. Es waren jeweils zwei verschiedene Gewebeproben der beiden Patienten untersucht worden. Bei einem wurde histologisch eine Mischinfektion mit Mucor-Arten und *Candida* spp. diagnostiziert. In beiden Gewebeproben konnte mittels Zygomyceten-PCR und Sequenzierung *Cunninghamella*-spezifische DNA identifiziert werden und in einer davon zusätzlich *A. fumigatus* DNA. Bei dem zweiten Patienten war histologisch eine Zygomycose diagnostiziert und *Cunninghamella bertholletiae* kultiviert worden. Übereinstimmend damit wurde in beiden Gewebeproben ausschließlich mit der Zygomyceten-PCR DNA amplifiziert, die mittels Sequenzierung als *Cunninghamella* spp. spezifisch bestimmt wurde.

### 3.3 Identifizierung der Zygomyceten-PCR-Produkte

Mit den Sequenzen der PCR-Produkte erwarteter Basenlänge wurde ein BlastSearch, also ein Vergleich mit den in GenBank deponierten Sequenzen durchgeführt (National Center of Biotechnology Information, National Institutes of Health; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Nur bei kompletter Übereinstimmung mit einer 18S rDNA-Teilsequenz der Datenbank wurde das Ergebnis als spezifisch und damit positiv gewertet. Andernfalls, wenn die Sequenz bis zu 95% Homologie zu diversen 18S rDNA-Sequenzen von insbesondere Basidiomyceten oder zu Sequenzen humaner Gene aufwies, wurde eine unspezifische Amplifikation angenommen, dieses vermerkt und das Ergebnis der PCR als negativ gewertet.

Es wurden zwölf PCR-Produkte als spezifische DNA von *Rhizomucor* spp. identifiziert. Es zeigte sich, dass die gewählte Teilsequenz keine Differenzierung der beiden *Rhizomucor*-Arten *R. pusillus* und *R. miehei* zulässt, da die 18S rDNA-Sequenz beider Spezies in dieser Teilsequenz zu 100% identisch ist. Andere Spezies dieser Gattung, wie auch andere Zygomyceten, weisen jedoch Unterschiede in dieser Teilsequenz auf, so dass die Sequenzierung eine Zuordnung des Produktes zu ausschließlich diesen beiden Spezies gestattete, was als Nachweis von DNA von *Rhizomucor* spp. bezeichnet wurde.

Ähnliches gilt für die Arten der Gattung *Cunninghamella*. Zwar gestattet die Sequenzierung eine eindeutige Zuordnung zu Arten ausschließlich dieser Gattung, aber die einzelnen humanpathogenen Spezies *Cunninghamella berthelotiae*, *C. echinulata* und *C. elegans* unterscheiden sich in der amplifizierten Teilsequenz ihrer 18S rDNA nicht. Daher wurde das Ergebnis als *Cunninghamella* spp. mitgeteilt. In sechs Gewebeproben wurde spezifische DNA dieser Gattung nachgewiesen, in weiteren fünf Proben DNA der Spezies *Absidia corymbifera* sowie spezifische DNA der Arten *Rhizopus oryzae* und *Mucor hiemalis* in jeweils zwei Gewebeproben. In GenBank wird der Name von *Rhizopus oryzae* verwendet, der auch als Artnamen im Index fungorum gelistet

ist ([www.indexfungorum.org](http://www.indexfungorum.org)). Erstmals in der Literatur wurde dieser Pilz von A. Fisch 1892 beschrieben und als *R. arrhizus* bezeichnet, während die Bezeichnung *R. oryzae* auf eine 1895 erschienene Arbeit zurückgeht. In der bakteriologischen Taxonomie gilt als Arname typischerweise der erste in der wissenschaftlichen Literatur verwendete und entsprechend bezeichnet eine weitere Referenzstelle ([www.doctorfungus.org](http://www.doctorfungus.org)) den Erreger als *R. arrhizus* mit dem Hinweis, dass der Name *R. oryzae* obsolet ist. Ohne den taxonomischen Widerspruch werten zu wollen wird in der vorliegenden Arbeit der Arname *R. oryzae* in Übereinstimmung mit der Datenbank Genbank verwendet.

### 3.4 Nachweis der Zygomycetenspezies in den verschiedenen Organen

In einem der beiden Rentierblöcke wurde mit der Zygomyceten-spezifischen PCR *Rhizomucor* spp. nachgewiesen, im zweiten Block wurde *Absidia corymbifera* detektiert. Die Speziesverteilung der humanen Proben, die in der Zygomyceten-PCR ein spezifisches Amplifikat aufwiesen, ist in Tabelle 18 dargestellt.

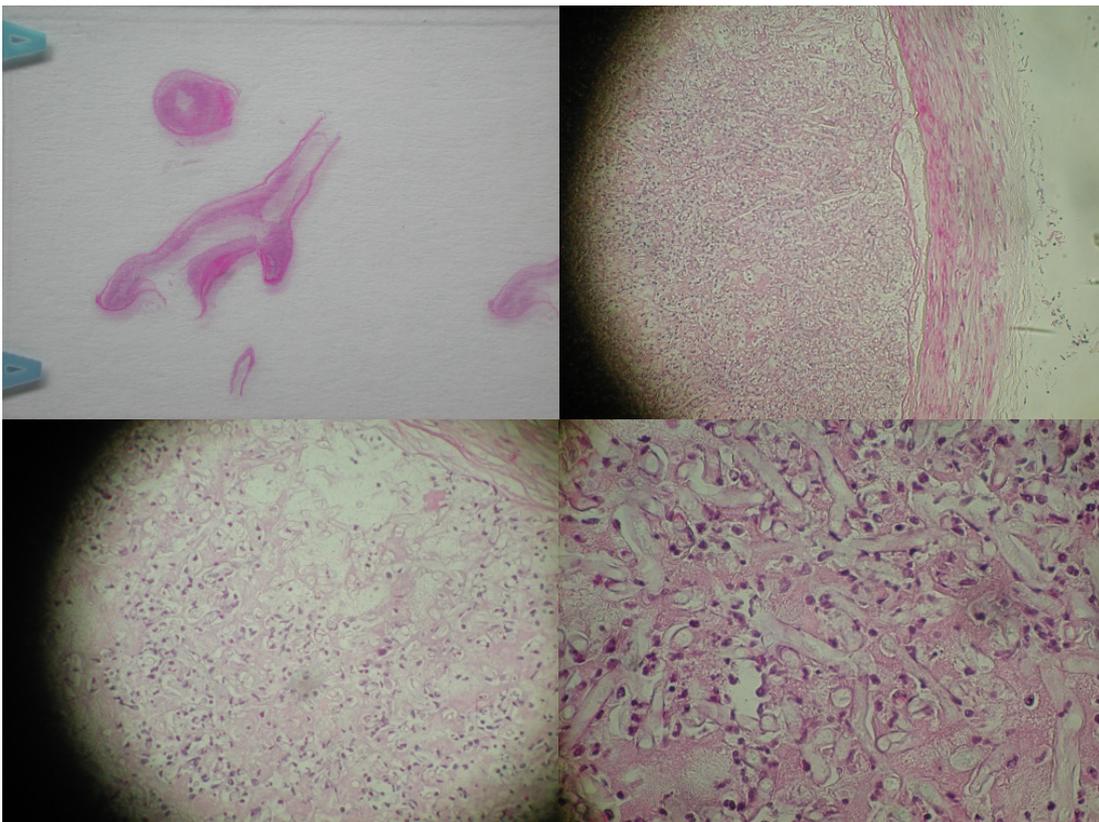
**Tab. 18:** Nachweis spezifischer DNA verschiedener Zygomycetenarten in humanen Organen

Organ	<i>Absidia corymbifera</i>	<i>Cunninghamella</i> spp.	<i>Mucor hiemalis</i>	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>Rhizopus oryzae</i>
Arteria cerebri media	-	-	-	-	1
Leber	1	-	-	-	-
Lunge	3	4	-	2	-
Muskel	-	2	-	-	-
Nase/Rachen	-	-	2	8	-
ZNS	-	-	-	1	1

Die Möglichkeit der Artidentifizierung von Pilzelementen im Gewebe soll exemplarisch anhand zweier Kasuistiken dargestellt werden:

### 1. Arteria cerebri media - Präparat

Eine Patientin mit Leukämie verstarb, wie sich bei der Obduktion herausstellte, an einem Verschluss der Arteria cerebri media mit einer Infarzierung des umliegenden Gewebes. Die Histologie zeigte eine intravasale Ansammlung von Pilzelementen, die zu Zygomyceten zugehörig identifiziert wurden (Abb. 7). Kulturen konnten nicht mehr angelegt werden, da kein natives Material mehr vorlag. Mit der hier entwickelten PCR konnte DNA amplifiziert werden. Die Sequenzierung ergab *Rhizopus oryzae*. Somit konnte retrospektiv die verursachende Spezies identifiziert werden.



**Abb. 7:** PAS gefärbte Arteria cerebri media: makroskopisch ist eine das Lumen verengende Ablagerung erkennbar (Längs- und Querdurchmesser links oben), die mikroskopisch aus breiten, rechtwinklig abzweigenden Hyphen besteht (rechts oben: 100fache, links unten: 200- und rechts unten: 400fache Vergrößerung im Original)

## 2. Rentiere

Zwei Rentiere, die von Nordeuropa nach Österreich importiert worden waren, verstarben kurz hintereinander. Die Histologie ergab in beiden Fällen eine Infektion mit Zygomyceten. Mittels PCR wurde einmal *Rhizomucor* spp.- und einmal *Absidia corymbifera* –DNA amplifiziert.

### 3.5 Organbezogene PCR-Diagnostik

Von insgesamt 30 Proben mit histologischem und/oder kulturellem Pilznachweis der Nasen/Rachenregion einschließlich Nasenneben- und Augenhöhlen wurde bei 20 (67%) eine Pilzinfektion mit mindestens einer der spezifischen PCRs detektiert. In 16 von 23 Lungenproben (70%) wurde eine Pilzspezies mittels PCR identifiziert. Beide ZNS und beide Muskelproben waren in der PCR-Diagnostik positiv, ebenso die Leber- und Arteria cerebri media-Probe. In der Hautprobe konnte keine Pilz-DNA detektiert werden, von den beiden Nierenproben war nur eine positiv. Wie gezeigt, konnte in beiden Rentierproben die ursächliche Zygomycetenspezies mittels PCR identifiziert werden.

### 3.6 Vergleich der PCR-Ergebnisse mit Kultur- und Histologie-Daten

Von insgesamt 77 Proben wurde bei 56 histologisch eine Pilzinfektion nachgewiesen, die bei 19 der Proben kulturell gesichert wurde. Bei 35 der 56 Proben (62,5%) stimmte das PCR-Ergebnis mit Kultur und Histologie überein. Bei einer ausschließlich histologisch diagnostizierten Zygomycose wurde mit der PCR zusätzlich zur spezifischen DNA einer Mucor-Art auch *Aspergillus fumigatus*-spezifische DNA amplifiziert. In weiteren zwei histologisch als Zygomycose diagnostizierten Proben wurde mittels PCR-Verfahren ausschließlich *Aspergillus fumigatus*-spezifische DNA amplifiziert. In zwei histologisch als Mischinfektion mit *Aspergillus* spp. und Zygomyceten diagnostizierten Proben wurde mittels PCR-Verfahren ausschließlich Zygomyceten-spezifische DNA amplifiziert, die eine Speziesbestimmung ermöglichte. Insgesamt wurde somit in 40 von 56 Proben (71,4%) mit

histologischem und/oder kulturellem Nachweis einer Schimmelpilzinfektion spezifische *Aspergillus fumigatus*- und/oder DNA einer definierten Zygomycetenart nachgewiesen.

Bei zwei Proben mit histologisch nicht näher bezeichneten Pilzinfektionen konnte einmal eine Mischinfektion von *Aspergillus fumigatus* und *A. nidulans* nachgewiesen werden. In der zweiten Probe wurde sowohl *A. fumigatus*-spezifische DNA als auch *Cunninghamella* spp. –DNA mittels PCR-Verfahren und Sequenzierung nachgewiesen. In drei Proben von Patienten mit klinischem Verdacht einer Pilzinfektion ohne histologischen Erregernachweis konnte pilzspezifische DNA mittels PCR-Verfahren detektiert werden.

Zählt man diese fünf Proben zu den Materialien mit nachgewiesener Pilzinfektion, dann wurde bei 45 der 61 Proben (73,8%) mit Nachweis einer Pilzinfektion diese mit der PCR nachgewiesen und der Erreger mittels Sequenzierung identifiziert.

### **3.6.1 Nachweisgrenze der PCR-Methoden**

In beiden PCR-Verfahren konnte bei minimalem Einsatz von 0,1 fg klonierter Plasmid-DNA ein Amplifikat im Gel nachgewiesen werden. Diese untere Nachweisgrenze war bei wiederholten Versuchen reproduzierbar. Die Anzahl der Genkopien pro Genom ist nicht bekannt. Ausgehend von bis zu 40 Kopien pro Genom ergibt sich eine Nachweisgrenze von etwa fünf Genomäquivalenten.

### **3.6.2 Sensitivität und Spezifität der PCR-Methoden**

Zur Berechnung der Sensitivität und Spezifität der PCR-Methoden muss klar sein, welche Pilzart im vorhandenen Paraffinschnitt bzw. in der Biopsie vorliegt. Die sensitivste Nachweismethode einer Pilzinfektion ist derzeit die Histologie. Die hier untersuchten Proben wurden alle histologisch, aber nicht immer zusätzlich kulturell aufgearbeitet. Die histologische Differenzierung zwischen Aspergillosen und Zygomykosen ist im Einzelfall sehr schwierig, des Öfteren werden Aspergillosen den Zygomykosen zugeordnet (Hayden et al., 2002).

Demzufolge ist die Sensitivität und Spezifität dieser PCR-Methoden bezogen auf die Histologie nur begrenzt aussagefähig.

**Sensitivität der Zygomyceten-PCR.** Bei 29 der 77 Proben wurde histologisch eine Zygomycose diagnostiziert. In 18 dieser Proben (63%) konnte mittels PCR die ursächliche Spezies der Ordnung Mucorales identifiziert werden.

**Sensitivität der Aspergillus-PCR.** Von 20 histologisch gesicherten Aspergillose wurden 14 mittels PCR als Aspergillose identifiziert (70%).

Definiert man Spezifität als Anzahl der Proben, in denen mittels Zygomyceten-PCR kein Amplifikat erzielt wurde, wenn histologisch eine Aspergillose diagnostiziert wurde und vice versa, ergeben sich folgende Berechnungen:

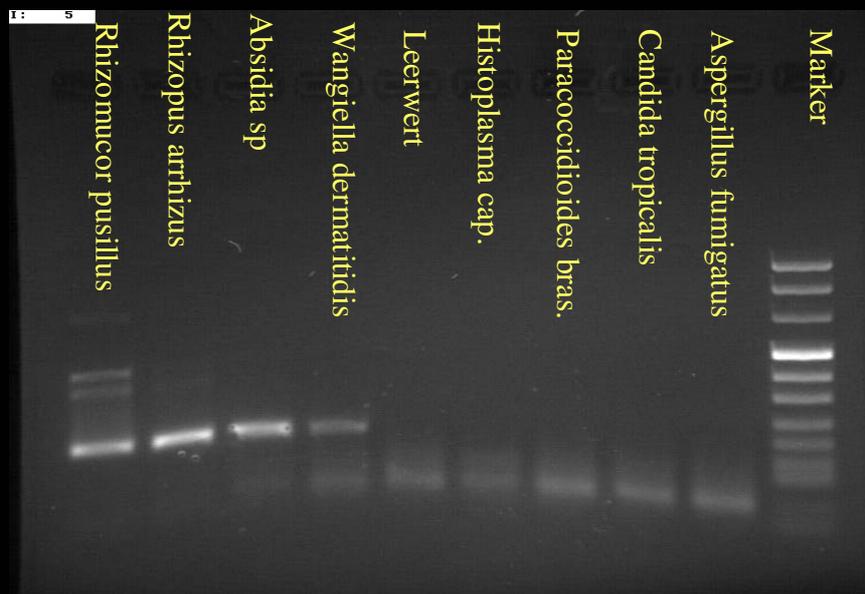
**Spezifität der Zygomyceten-PCR.** Bei 20 histologisch diagnostizierten Aspergillose wurde mit der Zygomyceten-PCR zweimal DNA der Größe von ca. 177 bp amplifiziert, die sich nach der Sequenzierung jedoch als unspezifisch erwies. Insgesamt wurde also in keiner der 20 Proben Zygomyceten-spezifische DNA mit der PCR amplifiziert, was einer Spezifität von 100% entspricht.

**Spezifität der Aspergillus-PCR.** Von 29 histologisch diagnostizierten Zygomycosen wurde mit der Aspergillus-PCR in drei Proben DNA nachgewiesen, wobei bei einer Probe zusätzlich Zygomyceten-DNA amplifiziert wurde. Somit wurde bei 26 der histologisch gesicherten Zygomycosen mit den Aspergillus-Primern keine DNA amplifiziert, was einer Spezifität von 90% entspricht.

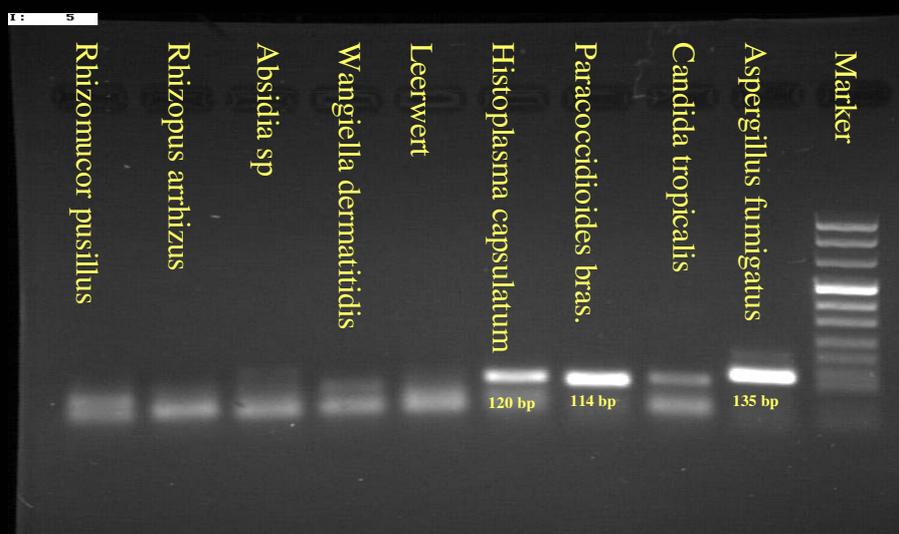
Zur Bestimmung der Spezifität wurden zusätzlich Untersuchungen mit Pilzstämmen aus dem Labor von Dr. Rinaldi, Fungus testing laboratory, San Antonio, Texas, USA, durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt. Die fraglichen Produkte der Zygomyceten-PCR mit DNA von *Wangiella dermatitidis* („Schwärzepilz“, Erreger von Phäohyphomykosen) und

der Aspergillus-PCR mit *Candida tropicalis* waren bei Wiederholung nicht reproduzierbar.

## Zygomyzeten nested PCR



## Aspergillus nested PCR



**Abb. 8:** Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele mit Produkten der Zygomyzeten- (oben) und Aspergillus nested PCR-Verfahren. Neben der mit Leerwert gekennzeichneten PCR-Kontrolle wurde die DNA folgender Laborpilzstämmen verwendet (von links nach rechts): *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus oryzae*, *Absidia* spp., *Wangiella dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* (Marker: Fragmentlänge der Banden von oben nach unten: 1114, 900, 692, 501/489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 bp)

### 3.7 Kontrollen

Die mitgeführten Extraktionskontrollen, wie auch die Leerwerte der ersten und zweiten Reaktionen beider PCR-Verfahren, wiesen keine Amplifikate im Agarosegel auf, so dass Kontaminationen während der Extraktion als auch „carry-over“-Kontaminationen während der Reaktionsansätze weitgehend ausgeschlossen werden konnten. Als Negativkontrolle wurde die aus dem Blut eines Gesunden extrahierte DNA verwendet. Diese zeigte gelegentlich Banden im Agarosegel mit einer Basenpaarlänge von 400 bis 1000 bp, so dass es sich am ehesten um unspezifische Amplifikationen oder Bruchstücke humaner DNA handelte, aber nicht um spezifische Produkte erwarteter Basenpaarlänge.

Da die mitgeführten Positivkontrollen konstant eine Bande in erwarteter Länge im Agarosegel aufwiesen, konnten optimale Reaktionsbedingungen angenommen und die Ergebnisse gewertet werden.

Inhibitoren als Ursache eines negativen PCR-Ergebnisses wurden ausgeschlossen, da die Zugabe der Zielsequenz in geringer Konzentration immer zu einem spezifischen Amplifikat führte.

**Nachweis erfolgreicher DNA-Extraktion.** Aus zwei Proben ließ sich trotz wiederholter DNA-Extraktion weder mit der  $\beta$ -Globin-PCR noch mit der sensitiveren nested GAPDH-PCR humane DNA amplifizieren. Diese Proben wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

### 3.8 Multiplex-Verfahren

Dieses Verfahren wurde wie unter 2.3.7 beschrieben aufgebaut. Im ersten Versuch wurde deutlich, dass die Aspergillus-Primer bevorzugt amplifizierten und im Gelbild ein viel intensiveres Amplifikat zeigten, so dass die unterschiedliche Basenpaarlänge zwischen Zygomyceten- und Aspergillus-spezifischen PCR-Produkten nicht erkennbar war. Daraufhin wurden die

Aspergillus- und Zygomyceten-Primer in ihren Konzentrationen mehrfach variiert wie auch die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration. Bei keiner dieser Kombinationen konnte jedoch die hohe Sensitivität der einzeln durchgeführten PCR erreicht werden.

### **3.9 Fragmentextraktion aus dem Agarosegel**

Üblicherweise wurden die nested PCR-Produkte wie unter 2.3.8 beschrieben aufgereinigt und sequenziert. In fünf Fällen führte dies zu Überlagerungen, so dass die Sequenzen nicht bestimmt werden konnten. Daher wurde die unter 2.3.9 beschriebene Fragmentextraktion aus dem Agarosegel durchgeführt. Bei drei Proben konnte das Amplifikat in der Zygomyceten-PCR nicht weiter spezifiziert werden. Aber bei zwei Proben konnte einmal *Cunninghamella* spp. und einmal *Absidia corymbifera*-spezifische DNA identifiziert werden.

## **4 Diskussion**

Die zwei PCR-Verfahren zur Identifizierung und Diskriminierung von Aspergillosen und Zygomykosen in Gewebeproben wurden erfolgreich evaluiert. Bei Patienten mit invasiver Aspergillose und/oder Zygomykose konnten Amplifikate nachgewiesen werden, nicht aber bei anderen Pilzinfektionen.

Von 61 histologisch nachgewiesenen Pilzinfektionen wurde mit den beiden PCR-Verfahren bei 45 Proben (73,8%) die DNA von einem bzw. mehreren pathogenen Pilzen nachgewiesen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ermöglichte eine Identifizierung der Spezies oder zumindest der Gattung des ursächlichen Pilzes.

Es wurden bereits mehrere Studien über PCR-Verfahren, Hybridisierung und Sequenzierung zur Identifizierung von Kulturen der Zygomyceten veröffentlicht (Makimura et al., 1994, Kappe et al., 1998). Allerdings ergeben sich bei der Anlage von Kulturen Probleme. Zum einen geht durch die Kulturdauer der

Zygomyceten von ein bis sieben Tagen wertvolle Zeit verloren (Ribes et al., 2000) und die Sensitivität der Kultur ist niedrig (Ribes et al., 2000). In der Studie von Nosari et al. (2003) wurde nur aus 43% der Gewebeproben mit definierter Pilzinfektion ein Erreger kultiviert. Dabei wurde ausschließlich *Aspergillus* spp. angezüchtet, während keine Zygomyceten wuchsen. Ribes et al. (2000) sprechen in ihrer Übersichtsarbeit von zahllosen Fällen, bei denen Kulturen von Autopsien und intra vitam entnommenen Proben steril blieben. Mit der neu entwickelten PCR können klinische Proben direkt untersucht werden, so dass der Zeitverlust durch Inkubation und die geringe Sensitivität der Kultur vermieden werden kann. Bislang wurden keine Untersuchungen zum Nachweis von Zygomyceten Genera oder Spezies aus Paraffinblöcken oder Biopsien mit Hilfe eines PCR-Verfahrens publiziert.

Zum Nachweis *Aspergillus*-spezifischer DNA wurden mehrere PCR-Verfahren etabliert. Einsele et al. (1997) entwickelten eine PCR zum Nachweis der *Aspergillus*-spezifischen DNA im Blut. Laut Autoren sollten hierbei zur Erhöhung der Sensitivität möglichst nicht nur eine, sondern zwei Blutproben pro Patient analysiert werden und die PCR-Amplifikate anschließend hybridisiert werden. Folglich ist der Arbeitsaufwand, im Vergleich zu dem in dieser Doktorarbeit vorgestellten PCR-Verfahren, doppelt so groß. Lass-Flörl et al. (2004) verglichen *Aspergillus*-PCR-Ergebnisse von Vollblutproben mit denen von Gewebeproben. Dabei zeigte sich eine höhere Sensitivität bei Verwendung von Gewebeproben, insbesondere wenn eine antifungale Therapie bereits begonnen worden war.

Eine PCR zur Detektion *Aspergillus*-spezifischer mitochondrialer DNA in Proben bronchoalveolärer Lavage (BAL) wurde von Bretagne et al. (1995) entwickelt. Jones et al. (1998) modifizierten diese PCR zu einem PCR-ELISA und untersuchten damit ebenfalls Proben der BAL. In Anlehnung an diese beiden Arbeiten entwickelten Rantakokko-Jalava et al. (2003) eine Real-Time PCR zur Detektion von *Aspergillus fumigatus* in BAL-Proben. Aber schon Bretagne et al. (1995) beschrieben den Vorhersagewert positiver PCR-Ergebnisse aus BAL-Proben als sehr niedrig. Rantakokko-Jalava et al. (2003) untersuchten in ihrer

Studie zusätzlich Gewebeproben von zehn Patienten und konnten damit nachweisen, dass die PCR prinzipiell auch bei diesen Proben einsetzbar ist. Deshalb wurde dieses bereits bewährte PCR-Verfahren zum Nachweis *Aspergillus*-spezifischer DNA verwendet. Zur Erhöhung der Sensitivität wurde es zu einem semi-nested Verfahren modifiziert.

**PCR im Vergleich zur in situ-Hybridisierung.** Eine in situ-Hybridisierung zur Diskriminierung fadenförmiger Pilze in Gewebeschnitten wurde von Hayden et al. (2002) etabliert. Die Autoren untersuchten 61 in Paraffin eingebettete Proben verschiedener Gewebe. Bei jeder Probe lag die histologische Diagnose einer Pilzinfektion vor, die mittels Kultur gesichert worden war. Es handelte sich um 27 Aspergillosen, 13 Zygomycosen und 21 Candida-Infektionen. Zur Identifizierung von Zygomyzeten wurden vier Nukleotidsonden eingesetzt, die an die 18S rDNA binden. Eine der Nukleotidsonden diente zur Eingrenzung auf vier Genera (*Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp., *Saksenaea* spp.), die anderen drei identifizierten jeweils eine Gattung bzw. Spezies (*Absidia corymbifera*, *Apophysomyces elegans*, *Cunninghamella* spp.). Zum Nachweis von *Aspergillus* spp. wurden zwei Nukleotidsonden, die zur 5S rDNA komplementär sind, genutzt. Danach folgte die Posthybridisierung und anschließend eine Bearbeitung der Proben mit dem Digoxigenin detection kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Die Sensitivität bei der Detektion von Zygomyzeten und auch Aspergillen lag mit der Panfungus-Sonde und den spezifischen Sonden bei jeweils über 90%. Die Spezifität wurde bei Aspergillosen mit 100%, bei Zygomycosen mit 87% angegeben. Hierbei handelte es sich aber um ausgewählte Proben, die von den Autoren noch einmal histologisch untersucht worden waren um sicher zu gehen, dass noch genügend Pilzmaterial im Gewebeschnitt vorhanden war. Von ursprünglich 119 Proben wurden anschließend nur noch 61 für die Studie verwendet. Laut den Autoren waren einige Fälle von Zygomycosen aufgrund des zu schwachen Fluoreszenzsignals und der vergleichsweise hohen Hintergrundfärbung nicht interpretierbar. Weiterhin wurden zwei Gewebeproben durch die Hybridisierung

als Aspergillosen identifiziert, histologisch waren aber Zygomycosen diagnostiziert worden.

In der Studie von Hayden et al. (2002) war die Sensitivität der in situ-Hybridisierung der Sensitivität der Histologie unterlegen. Mit der in situ-Hybridisierung konnte nicht zwischen *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Rhizopus* spp. und *Saksenaea vasiformis* differenziert werden. Die Differenzierung zwischen den Zygomycetengattungen ist aber für die Therapie von großer Bedeutung, da die in vitro nachgewiesene Sensitivität der Medikamente gattung-, spezies- und manchmal sogar isolatabhängig ist (Sun et al., 2002). Mit der hier neu beschriebenen Zygomyceten-PCR kann die Gattung und oft auch die Spezies identifiziert werden.

**Immunhistochemischer Nachweis von Aspergillosen und Zygomycosen in Gewebeproben.** Jensen et al. entwickelten monoklonale Antikörper zum Nachweis boviner Zygomycosen und Aspergillosen (Jensen et al., 1996 a, b). Diese Antikörper wurden in einer retrospektiven Studie in Paraffin eingebettetem Material von 23 Patienten mit der herkömmlichen histologischen Diagnostik verglichen (Jensen et al., 1997). Die Autoren untersuchten die Gewebeschnitte zusätzlich mit jeweils einem polyklonalen Antikörper auf *Candida* spp., *Fusarium* spp. und *Pseudallescheria* spp.. Die Antikörper waren in vorherigen Studien bezüglich ihrer Monospezifität getestet worden (Jensen et al., 1996 a-c). Die Autoren konnten in der Studie in drei Proben, in denen die Histologen keine Pilzelemente detektierten, immunhistochemisch drei Aspergillosen nachweisen. Bei vier Proben konnte die Histologie keine Zuordnung der Pilzinfektion treffen, die die Immunhistologie als drei Candidosen und eine Doppelinfektion von *Aspergillus* spp. und *Candida* spp. identifizierte. Nach Meinung der Autoren konnte die Immunhistologie die Sensitivität und Spezifität der histologischen Untersuchung steigern. Eine Spezies- oder Gattungsidentifizierung von Zygomyceten erlaubte die Immunhistochemie aufgrund von gemeinsamen Antigenen jedoch nicht.

**Sequenzierung der PCR-Produkte.** In GenBank sind von der mitochondrialen *Aspergillus*-DNA nur die Sequenzen von *A. fumigatus* und *A. nidulans* vorhanden. Laut Bretagne et al. (1995) kann mit der PCR aber die DNA von anderen *Aspergillus*arten amplifiziert werden. In dieser Arbeit lagen allerdings fast ausschließlich Infektionen mit *Aspergillus fumigatus* vor und nur einmal wurde zusätzlich DNA von *A. nidulans* nachgewiesen. Diese Mischinfektion konnte anhand der Sequenzierung entdeckt werden. Im Gelbild war kein Unterschied im Vergleich zu einer alleinigen *A. fumigatus*-Infektion erkennbar.

Die Zielsequenzen der beiden PCR-Verfahren liegen in konservierten Genen (Wu et al., 2003), so dass bei verschiedenen Familienmitgliedern nur geringe Sequenzunterschiede auftreten. Aufgrund dieser geringen Unterschiede sind Amplifikate verschiedener Spezies im Agarosegel nicht differenzierbar. Aber mit Hilfe der Sequenzierung können die Gattung und oft auch die Spezies identifiziert werden.

Auch die ribosomale DNA von pathogenen und kontaminierenden Pilzspezies sind eng miteinander verwandt. Dies wird am RNA Lebensbaum deutlich (Katz, 1998). So ergaben sich bei den hier untersuchten Proben unspezifische Amplifikationen und Nachweise von Basidiomyzeten-DNA, ubiquitär vorkommende Pilze mit geringer humanpathogener Bedeutung. Nach einer Studie von Buzina et al. (2003) können Basidiomyzeten bei Patienten mit chronischer Rhinosinusitis in 23,8% und bei gesunden Menschen in 13% in den Nasennebenhöhlen nachgewiesen werden. Die Zielsequenz der Zygomyceten-PCR erlaubt keine eindeutige Identifizierung einzelner Basidiomyzetenarten. Bei vergleichbarer Amplifikatgröße im Agarosegel ermöglicht aber die Sequenzierung eine Abgrenzung der Zygomyceten von kontaminierenden Basidiomyzeten.

Zusammengefasst ergeben die Daten, dass eine sichere Identifizierung der Pilzspezies anhand eines nachgewiesenen PCR-Amplifikats der 18S rDNA Teilsequenz im Agarosegel nicht möglich ist, jedoch erlaubt die Sequenzierung der Produkte eine eindeutige Zuordnung.

Eine sichere Speziesidentifizierung kann durch eine Hybridisierung von Oligonukleotiden nicht erreicht werden, da sich die Spezies in der untersuchten Teilsequenz der 18S rDNA sehr ähnlich sind. Beispielsweise unterscheiden sich *Mucor hiemalis* und *Rhizopus oryzae* in dieser Teilsequenz um nur acht Basenpaare (siehe Abb. 6). Eine Hybridisierungssonde bindet aber auch an DNA-Sequenzen, die nicht 100%ig komplementär sind (Hayden et al., 2002). Im Gegensatz dazu wird bei der Sequenzierung jede einzelne Base ermittelt. In manchen Fällen ist aber auch die Sequenzierung der 18S rDNA nicht suffizient um zwischen Spezies oder Genera zu unterscheiden (Bialek et al., 2002 b), beispielsweise ist eine Differenzierung von *Rhizomucor pusillus* und *Rhizomucor miehei* mit dieser Methode nicht möglich, da die 18S rDNA-Sequenz beider Spezies in dieser Teilsequenz zu 100% identisch ist.

Dieses Problem wurde in früheren Studien über Erreger endemischer Mykosen mit der Wahl von Genregionen, die für spezifische meist immunogene Proteine kodieren, umgangen (Bialek et al., 2000, - 2002 a, - 2003, - 2004). Für die meisten der zahlreichen Erreger der Mucor-Mykose und Aspergillose sind solche spezifische Proteine aber bisher nicht bekannt, respektive identifiziert worden.

**Nachweis spezifischer DNA verschiedener Zygomycetenarten.** In dieser Studie wurde in sechs Proben aus dem Universitätsklinikum Frankfurt *Cunninghamella* spp. identifiziert, während *Mucor hiemalis*-spezifische DNA ausschließlich in Proben der Nasen/Rachenregion aus einem Zentrum in Monterrey, Mexiko, nachgewiesen wurde. Aufgrund der geringen Probenzahl sind diese epidemiologischen Daten vorsichtig zu interpretieren und weitere Studien erforderlich, um geographische Besonderheiten zu belegen.

In dieser Studie wurde am häufigsten *Rhizomucor* spp. nachgewiesen. Im Gegensatz dazu finden sich in der Literatur *Rhizopus*-Arten als häufigste Erreger von Zygomykosen beim Mensch (Marchevsky et al., 1980, Tedder et al., 1994, Ribes et al., 2000). Die vorliegende Studie ist nicht umfangreich

genug, um die Diskrepanz abschließend zu beurteilen. Denkbar wäre, dass *Rhizopus* spp. noch am ehesten kultivierbar sind oder als ubiquitäre Keime am ehesten in Kulturen entdeckt werden oder dass die Auswahl von Gewebeproben des Nasopharynx die höhere Anzahl von *Rhizomucor*-Arten begünstigt. Es zeigt sich jedoch, dass die PCR-Verfahren für epidemiologische Untersuchungen prinzipiell geeignet sind.

**Organbezogener Nachweis von pilzspezifischer DNA.** In 67% der Proben der Nasen/Rachenregion und in 70% der Lungenproben wurde mit mindestens einer der PCRs spezifische DNA von einem Erreger der Mucor-Mykose und/oder Aspergillose detektiert. Die meisten Proben stammten aus den Atemwegen. Einerseits treten Pilzinfektionen bevorzugt in den Atemwegen auf, andererseits muss in Gewebeproben dieser Regionen am ehesten mit Kontaminationen ubiquitär vorkommender Pilzsporen gerechnet werden, so dass die Spezifität der PCR-Verfahren getestet werden kann. Die Ergebnisse der Proben von anderen Organen deuten darauf hin, dass der Nachweis spezifischer DNA mit diesem PCR-System prinzipiell aus jedem Organ möglich zu sein scheint.

**Fehlender Nachweis spezifischer DNA.** Bei acht Proben, in denen histologisch eine Pilzinfektion nachgewiesen wurde, konnte keine spezifische DNA amplifiziert werden. Der Nachweis amplifizierbarer humaner DNA gelang aus jeder Probe mit der nested GAPDH-PCR. Dieses nested-Verfahren ist sehr sensitiv und schon geringste Mengen humaner DNA werden damit detektiert. Dabei ist in einem Gewebeschnitt der prozentuelle Anteil nachweisbarer humaner DNA im Vergleich zu Pilz-DNA gewöhnlich höher. So kann in diesen acht Proben eine Pilz-DNA-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze nicht ausgeschlossen werden, wobei die DNA-Extrakte dieser Proben eingeeengt und nochmals mittels PCR untersucht wurden.

Diese Konzentrierung der DNA führte bei anderen fünf der 66 in Paraffin eingebetteten Proben zu einem erfolgreichen Nachweis von Pilz-DNA. Zweimal konnte so eine histologisch gesicherte Zygomycose durch die Amplifikation

*Rhizomucor* spp.-spezifischer DNA näher charakterisiert werden. In den anderen drei Proben wurde *Aspergillus fumigatus*-DNA nachgewiesen, was zweimal der histologischen Diagnose der Aspergillose entsprach. In einem Fall war histologisch eine Zygomycose diagnostiziert worden. Hier kann eine fehlerhafte Diagnose bei geringer Anzahl von Pilzelementen ebenso wenig wie eine Kontamination des Paraffinblocks mit *Aspergillus*-Sporen ausgeschlossen werden.

Der fehlende Nachweis von pilzspezifischer DNA kann aber auch dadurch zustande kommen, dass in den verwendeten Schnitten zur DNA-Extraktion keine Pilz-DNA mehr vorhanden war. In den darüber liegenden Schnitten der Histologie können dabei durchaus noch Hyphen erkennbar gewesen sein. Die Proben zur in situ-Hybridisierung bei Hayden et al. (2002) waren beispielsweise alle histologisch gesichert, wurden aber von der Arbeitsgruppe noch einmal histologisch aufgearbeitet um sicher zu stellen, dass im verwendeten Material zur in situ-Hybridisierung auch wirklich noch genügend Pilzelemente enthalten waren. Dieses Vorgehen führte zum Ausschluss von 58 der ursprünglich 119 Proben.

Für eine fokale Infektion, die nicht in allen Schichten detektierbar ist, spricht auch, dass in zwei Proben vom gleichen Patienten unterschiedliche Pilzinfektionen nachgewiesen wurden. In beiden Proben wurde derselbe Zygomycet detektiert, in einer Probe aber noch zusätzlich *Aspergillus fumigatus*. Eine Kontamination des Paraffinblocks kommt aber ebenfalls als Erklärung in Betracht.

Bei zwei Proben mit fehlendem Pilz-DNA Nachweis kann die Formalinfixation der Proben zur Schädigung der DNA geführt haben, v. a. wenn es sich um ungepuffertes Formalin handelte (Ohara et al., 1992, Zsikla et al., 2004). In beiden Fällen konnte auch nach wiederholter Extraktion keine humane DNA mit der nested GAPDH-PCR amplifiziert werden.

Die wiederholte Extraktion bei fehlendem Nachweis humaner DNA diente dem Ausschluss von Fehlern bei der Extraktion als Ursache negativer PCR-Befunde.

Bei vier zunächst GAPDH-negativen Proben wurde nach wiederholter Extraktion in allen Proben humane DNA nachgewiesen und einmal auch *Aspergillus fumigatus* DNA, die in den vorher verwendeten Schnitten nicht amplifiziert worden war.

**Vorteile der PCR-Diagnostik.** Eine definitive Diagnose einer Pilzinfektion erfordert eine Demonstration einer Gewebeinvasion von Pilzhyphen oder eine Pilzkultur eines üblicherweise sterilen Gewebes (Ascioglu et al., 2002). Prinzipiell kann mit Hilfe der Kultur einer steril gewonnenen Probe eine Identifizierung von Aspergillen und Zygomyceten erreicht werden. Die Inkubationsdauer von Zygomyceten liegt bei ein bis sieben Tagen (Ribes et al., 2000), wobei die Sensitivität, wie unter 1.3 ausgeführt, sehr niedrig ist (Ribes et al., 2000). Zudem sind immunsupprimierte Patienten häufig kolonisiert (Westney et al., 1996, Wald et al., 1997), ebenso häufig ältere Menschen (Soubani et al., 2004). Soubani et al. (2004) kultivierten bei allen 66 untersuchten Patienten (65 Jahre und älter) *Aspergillus* spp. aus den unteren Atemwegen. Von diesen 66 Patienten entwickelten aber nur drei eine invasive pulmonale Aspergillose und zwei ein Aspergillom. Weder klinische (z. B. Fieber, Husten, etc.) noch radiologische Befunde ermöglichten eine Unterscheidung von Infektion und Kolonisation.

Die histologische Differenzierung verschiedener Schimmelpilze ist nicht immer leicht, v. a. wenn keine reproduktiven Strukturen im Gewebeschnitt erkennbar sind (Hayden et al., 2002). Besonders schwierig ist die eindeutige Differenzierung von Hyphen bei Aspergillose, anderer Hyalohyphomykosen und bei Zygomycosen. Zygomycetenhyphen haben eigentlich keine bzw. wenige Septen, aufgrund ihrer dünnen Wand kollabieren die Hyphen aber gelegentlich, so dass sie septiert erscheinen können. So wird eine Zygomycose selbst von erfahrenen Untersuchern gelegentlich als Aspergillose interpretiert (Jensen et al., 1997, Hayden et al., 2002). Die Gewebeproben von *Fusarium* spp. und *Pseudallescheria* spp. werden dagegen leicht mit *Aspergillus* spp. verwechselt (Chandler et al., 1980, Kaufman, 1992, Jensen et al., 1996 c).

Mit den spezifischen PCR-Verfahren und der folgenden Sequenzierung kann die Gattung und häufig die Spezies sicher identifiziert werden, was weder mit der Histologie noch mit der in situ-Hybridisierung bisher sicher gelingt. Dies könnte aber bedeutsam sein für epidemiologische Studien und für retrospektive Analysen von erfolgreich bzw. erfolglos therapierten Pilzinfektionen.

In einer in vitro Studie von Diekema et al. (2003) mit 400 klinischen Schimmelpilzisolaten wurde in Bezug auf die Therapie von Aspergillosen deutlich, dass für das Erreichen der minimalen effektiven Konzentration (MEK) von Amphotericin B im Vergleich zu den neueren Antimykotika wesentlich höhere Konzentrationen erforderlich wären und selbst damit oft nicht die gleiche antimykotische Wirkung erreicht wird. Den Studienergebnissen zufolge ergeben sich unterschiedliche minimal effektive Konzentrationen (MEK) von Amphotericin B, Caspofungin, Itraconazol, Posaconazol, Ravuconazol und Voriconazol bei den einzelnen Aspergillusarten. Diese in vitro Daten zeigten, dass zur Behandlung von Zygomycosen die neueren Medikamente in hohen minimalen effektiven Konzentrationen erforderlich wären, Amphotericin B dagegen bei geringerer MEK gute antimykotische Wirksamkeit zeigt. Die Azolderivate Itraconazol und Voriconazol sowie das Echinocandin Caspofungin, haben eine unterschiedliche Wirksamkeit bei den verschiedenen Gattungen der Zygomyceten. Die notwendigen antifungalen Konzentrationen waren aber im Vergleich zu Amphotericin B stets höher, außer bei Isolaten von *Absidia corymbifera* (Sun et al., 2002, Diekema et al., 2003). Siwek et al. (2004) berichteten sogar von einer Zunahme der Zygomycosen unter Voriconazol-Prophylaxe bei hämatologisch-onkologischen Patienten. Bei Zygomyceten ist immer noch eine systemische Amphotericin B Behandlung die Therapie der Wahl, jedoch ist die in vitro Empfindlichkeit einzelner Spezies unterschiedlich. Daher kann die Identifizierung der jeweiligen Pilzspezies wesentlich für eine effektive Therapie sein.

Entsprechend kann bei erfolgreich therapierter Schimmelpilzinfektion retrospektiv analysiert werden, für welche Gattung oder Spezies der gewählte Therapieplan effektiv war (Tobón et al., 2003).

Durch eine schnelle und sichere Identifizierung von *Aspergillus* spp. und Erreger von Zygomykosen mittels PCR ist eine frühe, effektive antimykotische Therapie möglich, so dass eine Verbesserung der Prognose dieser häufig letalen Erkrankungen möglich erscheint (Pagano et al., 2004). Eine immunhistologische Untersuchung der Gewebeproben dauert nach Jensen et al. (1997) drei bis fünf Tage, wobei hier keine sichere Differenzierung zwischen den Gattungen bzw. Spezies möglich ist. Mit Hilfe der PCR und folgender Sequenzierung könnte die Diagnose innerhalb von 24 - 48 Stunden gestellt und der Therapieplan optimiert werden.

**Kontamination/Kolonisation versus Infektion.** Obwohl die Erreger der Aspergillose und Zygomykose als ubiquitär vorhandene Pilze gelten, wurde nur in wenigen Proben mit der PCR zusätzliche Pilz-DNA, verglichen mit den Histologieergebnissen, nachgewiesen. Gegen eine Kontamination während des Extraktionsablaufes und während des Ansetzens der PCR-Verfahren sprechen die fehlenden Amplifikate im Gelbild in den Spuren der Extraktions- bzw. PCR-Leerwerte. Zu dem wurden hauptsächlich Proben der Luftwege untersucht, in denen eine Kolonisation ohne Infektion vorhanden sein kann (Soubani et al., 2004). Die Luftwege von hospitalisierten Patienten können in bis zu 60% der Fälle mit Schimmelpilzen kolonisiert sein (Lass-Flörl et al., 1999). Trotzdem war in der Mehrzahl der Proben dieser Studie nur DNA einer oder keiner Pilzart nachweisbar. Dies spricht auch gegen häufige Kontaminationen während des Einbettens der Proben in Paraffin, was typischerweise nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt wird.

In einer histologisch diagnostizierten Zygomykose wurde mit der spezifischen PCR zusätzlich *Aspergillus fumigatus* detektiert und in zwei Proben mit ebenfalls histologisch nachgewiesener Zygomykose wurde ausschließlich *Aspergillus fumigatus* mit der PCR nachgewiesen. Diese Ergebnisse könnten durch eine Kontamination bedingt sein. Es ist aber auch eine fehlerhafte histologische Diagnose möglich, da die Differenzierung zwischen Aspergillosen und Zygomykosen histologisch besonders schwierig ist (Hayden et al., 2002).

**Sensitivität und Spezifität.** Zur Bestimmung der Sensitivität und Spezifität der PCR-Methoden muss die Pilzinfektion, die im Paraffinschnitt bzw. in der Biopsie vorliegt, eindeutig gesichert sein. Die Histologie, die kulturell bestätigt sein sollte, stellt den momentanen Goldstandard dar (Yeo and Wong, 2002). Die Sensitivität von Kulturen ist aber sehr gering (Ribes et al., 2000, Nosari et al., 2003). Die Sensitivität der Histologie ist teilweise höher als die der Kultur, v. a. bei fadenförmigen Pilzen (Renshaw, 1994), wenngleich in Einzelfällen Pilzinfektionen der histologischen Diagnose entgehen (Jensen et al., 1997).

Wie bereits mehrfach erläutert kann histologisch nicht immer der Stamm oder die Gattung des infizierenden Pilzes bestimmt werden. Die Differenzierung zwischen Aspergillosen und Zygomycosen ist dabei besonders schwierig. So wird eine Zygomycose gelegentlich als Aspergillose interpretiert (Hayden et al., 2002). In der Studie von Jensen et al. (1997) wurden von insgesamt 23 Patientenproben zwei Zygomycosen den Aspergillosen zugeordnet. Demzufolge ist bei Zygomycosen auf die histologische Diagnose nur begrenzt Verlass und die Spezifität dieser PCR-Methoden in Bezug auf die Histologie nicht eindeutig zu ermitteln.

Mit der Aspergillus-PCR wurde von 29 histologisch diagnostizierten Zygomycosen in drei jeweils ein Amplifikat erzielt, so dass eine Spezifität von 90% errechnet werden kann. Die DNA der drei PCR-Produkte wurde mittels Sequenzierung als *Aspergillus fumigatus*-spezifische DNA identifiziert. Ursächlich können Aspergillusinfektionen vorliegen, die in den histologischen Schnitten eventuell nicht sichtbar waren, ebenso denkbar wäre eine Kontamination während des Einbettens in Paraffin. Im Rahmen weiterer Studien mit Proben, die mit anderen Methoden zur Identifizierung von Pilzinfektionen untersucht werden, sollte die Spezifität der Methode genauer bestimmt werden.

**Histologische Aspergillosen ohne PCR-Nachweis.** Bei sechs von 18 histologisch definierten Aspergillosen stellte sich kein Amplifikat mit der PCR dar. Dies könnte daran liegen, dass es sich nicht um *Aspergillus fumigatus*-Spezies handelte. Laut Bretagne et al. (1995) wird zwar mit den Primern DNA

verschiedener Aspergilluspezies vervielfältigt, die Sequenzen sind aber nicht zum Vergleich in GenBank vorhanden. In Betracht kommen auch Schimmelpilzinfektionen mit *Fusarium* spp. und *Pseudallescheria* spp. sowie Candida-Infektionen. Die DNA der letztgenannten Pilze wird mit den hier beschriebenen PCR-Verfahren nicht amplifiziert. Jedenfalls konnte in den zwei Proben mit Doppelinfektionen von Zygomyceten und *Candida* spp. ausschließlich Zygomyceten-spezifische DNA nachgewiesen werden.

Histologisch können bei der Differenzierung zwischen diesen Gattungen aber Fehlzusammenordnungen getroffen werden. So wurden in der Studie von Jensen et al. (1997) drei Candidosen in der Histologie als Aspergillosen diagnostiziert. Auch die Gewebeformen von *Fusarium* spp. und *Pseudallescheria* spp. werden mit Hyphen von *Aspergillus* spp. verwechselt (Chandler et al., 1980, Kaufman, 1992, Jensen et al., 1996 c).

**Multiplex-Verfahren.** Mit dem Multiplex-Verfahren konnte die hohe Sensitivität der einzelnen PCRs nicht erreicht werden. Das identische Temperaturprofil beider PCR-Verfahren ermöglicht aber bei getrennten Reaktionsansätzen das gleichzeitige Einsetzen der Proben in den Thermocycler, so dass kein Zeitverlust im Vergleich zu einer Multiplex-PCR entsteht.

#### 4.1 Fazit

In dieser Arbeit wurde ein System von zwei PCR-Verfahren zur Diskriminierung und Identifizierung von Erregern der Mucor-Mykose und Aspergillose in Paraffin eingebetteten Proben und nativen Biopsien evaluiert.

Die entwickelten PCR-Verfahren bieten bei einem histologischen Nachweis von Pilzelementen die Möglichkeit Aspergillen und Zygomyceten zu unterscheiden und die Gattung bzw. Spezies zu identifizieren, so dass eine gezielte antimykotische Therapie dieser potenziell letalen Infektionen möglich ist.

Retrospektive Analysen aus Paraffin eingebettetem Probenmaterial sind mit Hilfe der beiden PCR-Verfahren für epidemiologische Studien möglich. Dies bietet auch die Möglichkeit erfolgreich therapierte Schimmelpilzinfektionen

retrospektiv zu analysieren um die antimykotische Therapie zukünftig zu optimieren.

Es wurde gezeigt, dass auch die Untersuchung von nativen Biopsien mit den beiden PCR-Verfahren möglich ist. Sensitivität und Spezifität der neu etablierten PCR-Methoden müssen in Studien weiter bestimmt werden, in denen histologische, kulturelle und molekularbiologische Diagnostik aus nativen Proben durchgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

Aspergillen und Zygomyceten sind ubiquitär verbreitete Fadenpilze, die bei immunsupprimierten Patienten schwere, oft tödliche, Infektionen hervorrufen können. Der frühzeitigen Diagnostik und Therapie kommt zur Senkung der Letalität eine große praktische Bedeutung zu, wobei die optimale antimykotische Therapie isolat- und speziesabhängig ist. Diese Pilzinfektionen sind mit den bislang zur Verfügung stehenden diagnostischen Mitteln nur unzureichend zu identifizieren und zu differenzieren. Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war die Evaluation zweier semi-nested PCR-Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von Erregern der Zygomykosen und Aspergillosen in Paraffin eingebetteten Gewebeproben und nativen Biopsien.

### Methode

**Zygomyceten.** Als Zielsequenz wurde die 18S rDNA gewählt. Das äußere Primerpaar ZM1: 5'-ATT ACC ATG AGC AAA TCA GA-3' und ZM 2: 5'-TCC GTC AAT TCC TTT AAG TTT C-3' amplifiziert ein 407 bis 408 bp langes Fragment. Bei der semi-nested PCR wird durch ZM 1 und ZM 3: 5'-CAA TCC AAG AAT TTC ACC TCT AG-3' ein 176 bis 177 bp langes Fragment des ersten Produktes begrenzt.

**Aspergillen.** Diese PCR wurde in Anlehnung an die Arbeit von Bretagne et al. (1995) aufgebaut. Sie dient dem Nachweis mitochondrialer *Aspergillus*-DNA. Mit den Primern P 1: 5'- GAA AGG TCA GGT GTT CGA GTC AC -3' und P 2:

5'-CTT TGG TTG CGG GTT TAG GGA TT-3' wird ein 135 bp langes Fragment der mitochondrialen DNA von *Aspergillus* spp. amplifiziert.

Zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität wurden P 1 und P 2 als semi-nested PCR-Primer verwendet und die Methode um einen äußeren Primer, Asp 2, ergänzt (Asp 2: 5'-GGG AGT TCA AAT CTC CCT TGG G-3'). P2 und Asp 2 amplifizieren ein 201 bp langes Fragment der mitochondrialen DNA von *Aspergillus fumigatus*.

## **Ergebnisse**

Insgesamt wurden 77 Proben untersucht, davon waren 66 Paraffin eingebettete Gewebeproben und elf native Biopsien. Bei 45 von 61 histologisch nachgewiesenen Pilzinfektionen wurde mit den beiden PCR-Verfahren die DNA von einem oder mehreren pathogenen Pilzen amplifiziert (73,8%). Die Sequenzierung der PCR-Produkte ermöglichte eine Identifizierung der Spezies oder zumindest eine Identifizierung der Gattung des ursächlichen Pilzes. Zwölf PCR-Produkte wurden als spezifische DNA von *Rhizomucor* spp. identifiziert. *Cunninghamella* spp. wurde in sechs Gewebeproben nachgewiesen, in weiteren fünf Proben DNA der Spezies *Absidia corymbifera* sowie spezifische DNA der Arten *Rhizopus oryzae* und *Mucor hiemalis* in jeweils zwei Gewebeproben. Die 24 PCR-Produkte der *Aspergillus*-spezifischen PCR wurden allesamt als *Aspergillus fumigatus* identifiziert, nur in einem Fall wurde DNA sowohl von *A. fumigatus* als auch von *A. nidulans* nachgewiesen.

## **Diskussion**

Die zwei erstmalig getesteten PCR-Verfahren zur Identifizierung und Diskriminierung von Aspergillosen und Zygomykosen wurden erfolgreich evaluiert. Bei Patienten mit invasiver Aspergillose und/oder Zygomykose konnten Amplifikate nachgewiesen werden, nicht aber aus Proben mit anderen Pilzinfektionen.

Mit den spezifischen PCR-Methoden und der folgenden Sequenzierung können innerhalb von 24 – 48 Stunden *Aspergillus*- und *Mucorales*-Arten in Gewebeproben nachgewiesen und identifiziert werden. Diese Methoden

ergänzen sich damit hervorragend zur Diagnostik, so dass eine frühe gezielte antimykotische Therapie begonnen werden könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

**Abramson, S.** 2001. The air crescent sign. *Radiology* **218**:230-232.

**Ansorg, R., R. van den Boom, and P. M. Rath.** 1997. Detection of *Aspergillus galactomannan* antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*. **40**(9-10):353-357.

**Ascioglu, S., J. Rex, B. de Pauw, J. Bennett, J. Bille, F. Crokaert, D. Denning, J. Donnelly, J. Edwards, Z. Erjavec, D. Fiere, O. Lortholary, J. Maertens, J. Meis, T. Patterson, J. Ritter, D. Selleslag, P. Shah, D. Stevens, and T. Walsh.** 2002. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An internal consensus. *Clin. Infect. Dis.* **34**:7-14.

**Bialek, R., A. Ibricevic, C. Aepinus, L. K. Najvar, A. W. Fothergill, J. Knobloch, and J. R. Graybill.** 2000. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2940-2942.

**Bialek, R., A. Feucht, C. Aepinus, G. Just-Nübling, V. J. Robertson, J. Knobloch, and R. Hohle.** 2002 a. Evaluation of two nested PCR assays for the detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1644-1647.

**Bialek, R., M. Weiss, K. Bekure-Nemariam, L. K. Najvar, M. B. Alberdi, J. R. Graybill, and U. Reischl.** 2002 b. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and real time PCR assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 461-469.

**Bialek, R., A. Cascante Cirera, T. Herrmann, C. Aepinus, V. I. Shearn-Bochsler, and A. M. Legendre.** 2003. Nested PCR assays for detection of *Blastomyces dermatitidis* DNA in paraffin-embedded canine tissue. *J. Clin. Microbiol.* **41**:205-208.

**Bialek, R., J. Kern, T. Herrmann, R. Tijerina, L. Cecenas, U. Reischl, and G. M. Gonzalez.** 2004. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline rich antigen. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 778-783.

**Bosi, A., B. Bartolozzi, A. M. Vannucchi, A. Orsi, S. Guidi, and P. Rossi Ferrini.** 2002. Polymerase chain reaction-based "pre-emptive" therapy with cidofovir for cytomegalovirus reactivation in allogeneic hematopoietic stem cells transplantation recipients: a prospective study. *Haematologica* **87**:446-447.

**Bretagne, S., J.-M. Costa, A. Marmorat-Khuong, F. Poron, C. Cordonnier, M. Vidaud, and J. Fleury-Feith.** 1995. Detection of *Aspergillus* species DNA in bronchoalveolar lavage samples by competitive PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1164-1168.

**Buzina, W., H. Braun, K. Freudenschuss, A. Lackner, W. Habermann, and H. Stammerger.** 2003. Fungal biodiversity – as found in nasal mucus. *Med. Mycol.* **41**:149-161.

**Caillot, D., O. Casasnovas, A. Bernard, J. F. Couaillier, C. Durand, B. Cuisenier, E. Solary, F. Piard, T. Petrella, A. Bonnin, G. Couillault, M. Dumas, and H. Guy.** 1997. Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J. Clin. Oncol.* **15**:139-147.

**Caillot, D., J. F. Couaillier, A. Bernard, O. Casasnovas, D. W. Denning, L. Mannone, J. Lopez, G. Couillault, F. Piard, O. Vagner, and H. Guy.** 2001. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed tomography scans in patients with neutropenia. *J. Clin. Oncol.* **19**:253-259.

**Carretto, E., D. Barbarini, F. Locatelli, E. Giraldi, N. Pellegrini, L. Perversi, P. Grossi, P. Marone, and F. Bonetti.** 2000. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infection in three children given allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: clinical and microbiologic features. *Haematologica* **85**:1158-1164.

**Chakrabarti, A., P. Kumar, A. A. Padhye, L. Chatha, S. K. Singh, A. Das, J. D. Wig, and R. N. Kataria.** 1997. Primary cutaneous zygomycosis due to *Saksenaia vasiformis* and *Apophysomyces elegans*. *Clin. Infect. Dis.* **24**:580-583.

**Chandler, F. W., W. Kaplan, and L. Ajella.** 1980. A color atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases. The Netherlands: Wolfe Medical Publications.

**Corpet, F.** 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Rec.* **16**:10881-10890.

**De Hoog, G. S., and J. Guarro.** 1995. Zygomycota. Atlas of clinical fungi. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.

**Denning, D. W.** 1996. Therapeutic outcome in invasive aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **23**:608-615.

**Denning, D. W.** 1998. Invasive Aspergillosis. *Clin. Infect. Dis.* **26**:781-805.

- Diekema, D. J., S. A. Messer, R. J. Hollis, R. N. Jones, and M. A. Pfaller.** 2003. Activities of Caspofungin, Itraconazole, Posaconazole, Ravuconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against 448 Recent Clinical Isolates of Filamentous Fungi. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3623-3626.
- Donnelly, J. P., and B. E. De Pauw.** 2004. Voriconazole – a new therapeutic agent with an extended spectrum of antifungal activity. *Clin. Microbio. Infect.* **10** (Suppl. 1):107-117.
- Einsele, H., H. Hebart, G. Roller, J. Löffler, I. Rothenhöfer, C. A. Müller, R. A. Bowden, J.-A. van Burik, D. Engelhard, L. Kanz, and U. Schumacher.** 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 1353-1360.
- Elgart, M. L.** 1996. Zygomycosis. *Dermatol. Clin.* **14**:141-146.
- Espinel-Ingroff, A., L. A. Oakley, and T. M. Kerkerling.** 1987. Opportunistic zygomycotic infections. *Mycopathologica* **97**:33-41.
- Eucker, J., O. Sezer, B. Graf, and K. Possinger.** 2001. Mucormycoses. *Mycoses* **44**: 255-60.
- Ferrinho, P. D. G. M.** 1985. Pulmonary phycomycosis without obvious predisposing factors. A case report. *S. Afr. Med. J.* **68**:893.
- Fridkin, S. K., and W. R. Jarvis.** 1996. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:499-511.
- Funada, H., and T. Matsuda.** 1996. Pulmonary mucormycosis in a hematology ward. *Intern. Med.* **35**: 540-544.
- Grossi, P., C. Farina, R. Fiocchi, and D. D. Gasperina.** 2000. Prevalence and outcome of invasive fungal infections in 1,963 thoracic organ transplant recipients: a multicenter retrospective study. *Transplantation* **70**: 112-116.
- Hauggaard, A., M. Ellis, and L. Ekelund.** 2002. Early chest radiography and CT in the diagnosis, management and outcome of invasive pulmonary aspergillosis. *Acta Radiol.* **43**:292-298.
- Hayden, R. T., X. Qian, G. W. Procop, G. D. Roberts, and R. V. Lloyd.** 2002. In situ hybridization for the identification of filamentous fungi in tissue section. *Diagn. Mol. Pathol.* **11**:119-126.
- Herbrecht, R., V. Letscher-Bru, R. A. Bowden, S. Kusne, E. J. Anaissie, J. R. Graybill, G. A. Noskin, Oppenheim, E. Andres, and L. A. Pietrelli.** 2001. Treatment of 21 cases of invasive mucormycosis with amphotericin B colloidal dispersion. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**: 460-466.

**Hessian, P., and J. M. B. Smith.** 1982. Antigenic characterization of some potentially pathogenic mucoraceous fungi. *Sabouraudia* **20**:209-216.

**Hitchcock, P., T. R. G. Gray, and J. C. Frankland.** 1997. Production of a monoclonal antibody specific to *Mycena galopus* mycelium. *Mycol. Res.* **101**:1051-1059.

**Husain, S., B. D. Alexander, P. Munoz, R. K. Avery, S. Houston, T. Pruett, R. Jacobs, E. A. Dominguez, J. G. Tollemar, K. Baumgarten, C. M. Yu, M. M. Wagener, P. Linden, S. Kushne, and N. Singh.** 2003. Opportunistic mycelial fungal infections in organ transplant recipients: emerging importance of non-*Aspergillus* mycelial fungi. *Clin. Infect. Dis.* **37**:221-229.

**Ingram, C. W., J. Sennesh, J. N. Cooper, and J. R. Perfect.** 1989. Disseminated zygomycosis. Report of four cases and review. *Rev. Infect. Dis.* **11**:741-754.

**Jensen, H. E., B. Aalbaek, and H. Schonheyder.** 1994. Immunohistochemical identification of aetiological agents of systemic bovine zygomycosis. *J. Comp. Pathol.* **110**:65-77.

**Jensen, H. E., B. Aalbaek, P. Lind, and H. V. Krogh.** 1996 a. Immunohistochemical diagnosis of systemic bovine zygomycosis by murine monoclonal antibodies. *Vet. Pathol.* **33**:176-183.

**Jensen, H. E., B. Aalbaek, P. Lind, H. V. Krogh, and P. L. Frandsen.** 1996 b. Development of murine monoclonal antibodies for the immunohistochemical diagnosis of systemic bovine aspergillosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* **8**:68-75.

**Jensen, H. E., H. C. Schonheyder, M. Hotchi, and L. Kaufman.** 1996 c. Diagnosis of systemic mycoses by specific immunohistochemical tests. *APMIS* **104**:241-258.

**Jensen, H. E., J. Salonen, and T. O. Ekfors.** 1997. The use of immunohistochemistry to improve sensitivity and specificity in the diagnosis of systemic mycoses in patients with haematological malignancies. *J. Pathol.* **181**:100-105.

**Jimenez, C., C. Lumbreras, J. M. Aguado, C. Loinaz, G. Paseiro, A. Andres, J. M. Morales, G. Sanchez, I. Garcia, A. del Palacio, and E. Moreno.** 2002. Successful treatment of *Mucor* infection after liver or pancreas-kidney transplantation. *Transplantation* **73**: 476-480.

**Jones, M. E., A. J. Fox, A. J. Barnes, B. A. Oppenheim, P. Balagopal, G. R. Morgenstern, and J. H. Scarffe.** 1998. PCR-Elisa for the early diagnosis of invasive pulmonary *Aspergillus* infection in neutropenic patients. *J. Clin. Pathol.* **51**:652-656.

**Kami, M., Y. Kish, T. Hamak, M. Kawabata, T. Kashima, T. Masumoto, Y. Oki, Y. Tanaka, S. Sawada, U. Machida, K. Ohtomo, Y. Kanda, H. Hirai, and Y. Mutou.** 2002. The value of the chest computed tomography halo sign in the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis. An autopsy-based retrospective study of 48 patients. *Mycoses* **45**:287-294.

**Kappe, R., C. N. Okeke, C. Fauser, M. Maiwald, and H.-G. Sonntag.** 1998. Molecular probes for the detection of pathogenic fungi in the presence of human tissue. *J. Med. Microbiol.* **47**:811-820.

**Karacan, O., S. Akcay, F. O. Eyuboglu, N. Celik, T. Colak, F. Timurkaynak, and B. Demirhan.** 2003. Invasive pulmonary aspergillosis in solid organ transplant recipients. *Tuberk. Toraks.* **51**:177-182.

**Katz, L. A.** 1998. Changing perspectives on the origin of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* **13**:493-497.

**Kaufman, L., L. F. Turner, and D. W. McLaughlin.** 1989. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.* **27**:1979-1982

**Kaufman, L.** 1992. Immunohistologic diagnosis of systemic mycoses: an update. *Eur. J. Epidemiol.* **8**:377-382.

**Kim, M. J., K. S. Lee, J. Kim, K. J. Jung, H. G. Lee, and T. S. Kim.** 2001. Crescent sign in invasive pulmonary aspergillosis: frequency and related CT and clinical factors. *J. Comput. Assist. Tomogr.* **25**:305-310.

**Kontoyiannis, D. P., V. C. Wessel, G. P. Bodey, and V. I. Rolston.** 2000. Zygomycosis in the 1990s in a tertiary-care cancer center. *Clin. Infect. Dis.* **30**: 851-856.

**Lake, F. R., R. McAleer, and A. E. Tribe.** 1988. Pulmonary mucormycosis without underlying systemic disease. *Med. J. Aust.* **149**:323-325.

**Lass-Flörl, C., G. Salzer, T. Schmid, W. Rabl, H. Ulmer, and M. Dietrich.** 1999. Pulmonary *Aspergillus* colonization in humans and its impact on management of critically ill patients. *Br. J. Haematol.* **104**:745-747.

**Lass-Flörl, C., E. Gunsilius, G. Gastl, H. Bonatti, M. C. Freund, A. Gschwendtner, G. Kropshofer, M. P. Dierich, and A. Petzer.** 2004. Diagnosing invasive aspergillosis during antifungal therapy by PCR analysis of blood samples. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4154-4157.

**Lehrer, R. I., D. H. Howard, and P. S. Sypherd.** 1980. Mucormycosis. *Ann. Intern. Med.* **9**:93-108.

**Letscher-Bru, V., A. Cavalier, E. Pernot-Marino, H. Koenjo, D. Eyer, J. Waller, and E. Candolfi.** 1998. *Aspergillus* galactomannan antigen detection by Platelia® *Aspergillus*: multiple positive antigenaemia without *Aspergillus* infection. *J. Mycol. Méd.* **8**:112-113.

**Lin, Q. Y., Y. H. Zhao, L. N. Yan, A. H. Huang, B. Li, S. C. Lu, Y. Zeng, T. F. Wen, J. C. Zhao, and N. S. Cheng.** 2003. Diagnosis and treatment of lung aspergillosis after liver transplantation. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* **41**:17-18.

**Logan, P. M., S. L. Primack, C. Staples, R. R. Miller, and N. L. Müller.** 1995. Acute lung disease in the immunocompromised host: diagnostic accuracy of the chest radiograph. *Chest* **108**:1283-1287.

**Maertens, J., H. Demuynck, E. K. Verbeken, P. Zachee, G. E. Verhoef, P. Vandenberghe, and M. A. Boogaerts.** 1999 a. Mucormycosis in allogenic bone marrow transplant recipients: report of five cases and review of the role of iron overload in the pathogenesis. *Bone Marrow Transplant* **24**: 307-312.

**Maertens, J., J. Verhaegen, H. Demuynck, P. Brock, G. Verhoef, P. Vandenberghe, J. Van Eldere, L. Verbist, and M. Boogaerts.** 1999 b. Autopsy-controlled prospective evaluation of serial screening for circulating galactomannan by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for hematological patients at risk for invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3223-3228.

**Maertens, J., J. Verhaegen, K. Lagrou, J. Van Eldere, and M. Boogaerts.** 2001. Screening for circulating galactomannan as a noninvasive diagnostic tool for invasive aspergillosis in prolonged neutropenic patients and stem cell transplantation recipients: a prospective validation. *Blood* **97**:1604-1610.

**Maicas, S., A. C. Adam, and J. Polaina.** 2000. The ribosomal DNA of the zygomycete *Mucor miehei*. *Curr. Genet.* **37**:412-419.

**Makimura, K., S. Y. Murayama, and H. Yamaguchi.** 1994. Detection of a wide range of medically important fungi by polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.* **40**:358-364.

**Marchevsky, A. M., E. J. Bottone, S. A. Geller, and K. Giger.** 1980. The changing spectrum of disease, etiology, and diagnosis of mucormycosis. *Hum. Pathol.* **11**:457-464.

**Miller, L. W., D. C. Naftel, R. C. Bourge, J. K. Kirklin, S. C. Brozena, J. Jarcho, R. E. Hobbs, and R. M. Mills.** 1994 a. Infection after heart transplantation: a multi-institutional study. *Transplantation* **13**: 381-393.

**Miller, W. T. Jr., G. J. Sais, I. Frank, W. B. Geffer, J. M. Aronchick, and W. T. Miller.** 1994 b. Pulmonary aspergillosis in patients with AIDS. Clinical and radiographic correlations. *Chest* **105**:37-44.

**Minari, A., R. Husni, R. K. Avery, D. L. Longworth, M. DeCamp, M. Bertin, R. Schilz, N. Smedira, M. T. Haug, A. Mehta, and S. M. Gordon.** 2002. The incidence of invasive aspergillosis among solid organ transplant recipients and implications for prophylaxis in lung transplants. *Transpl. Infect. Dis.* **4**:195-200.

**Nampoory, M. R., Z. U. Khan, K. V. Johny, J. N. Constandi, R. K. Gupta, I. Al-Muzairi, M. Samhan, M. Mozavi, and T. D. Chugh.** 1996. Invasive fungal infections in renal transplant recipients. *J. Infect.* **33**: 95-101.

**Nosari, A., P. Oreste, M. Montillo, G. Carrafiello, M. Draisci, G. Muti, A. Molteni, and E. Morra.** 2000. Mucormycosis in hematologic malignancies: an emerging fungal infection. *Haematologica* **85**: 1068-1071.

**Nosari, A., M. Anghilieri, G. Carrafiello, C. Guffanti, L. Marbello, M. Montillo, G. Muti, S. Ribera, A. Vanzulli, M. Nichelatti, and E. Morra.** 2003. Utility of percutaneous lung biopsy for diagnosing filamentous fungal infections in hematologic malignancies. *Haematologica* **88**:1405-1409.

**Ohara, Y., M. Honma, and Y. Iwasaki.** 1992. Sensitivity of the polymerase chain reaction for detecting human T-cell leukemia virus type I sequences in paraffin-embedded tissue. Effect of unbuffered formalin fixation. *J. Virol. Methods.* **37**:83-88.

**Pagano, L., C. Girmenia, L. Mele, P. Ricci, M. E. Tosti, A. Nosari, M. Buelli, M. Picardi, B. Allione, L. Corvatta, D. D'Antonio, M. Montillo, L. Melillo, A. Chierichini, A. Cenacchi, A. Tonso, L. Cudillo, A. Candoni, C. Savignano, A. Bonini, P. Martino, and A. Del Favero; GIMEMA Infection Program; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto.** 2001. Infections caused by filamentous fungi in patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GIMEMA Infection Program. *Haematologica* **86**:862-870.

**Pagano, L., M. Offidani, L. Fianchi, A. Nosari, A. Candoni, M. Piccardi, L. Corvatta, D. D'Antonio, C. Girmenia, P. Martino, and A. Del Favero; GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto) Infection Program.** 2004. Mucormycosis in hematologic patients. *Haematologica* **89**:207-214.

**Pasmans, H. L. M., O. J. L. Loosveld, H. C. Schouten, F. Thunnissen, and J. A. M. van Engelshoven.** 1992. Invasive aspergillosis in immunocompromised patients: findings on plain film and (HR)CT. *Eur. J. Radiol.* **14**:37-40

**Perea, S., and T. F. Patterson.** 2002. Invasive *Aspergillus* infections in hematologic malignancy patients. *Semin. Respir. Infect.* **17**:99-105.

**Pfaller, M. A., and D. J. Diekema.** 2004. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4419-4431.

**Picardi, M., A. Camera, L. Luciano, R. Ciancia, and B. Rotoli.** 2003. Intravenous itraconazole for treating invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **88**(2):ELT01.

**Pinto, P. S.** 2004. The CT halo sign. *Radiology* **230**:109-110.

**Rantakokko-Jalava, K., S. Laaksonen, J. Issakainen, J. Vauras, J. Nikoskelainen, M. K. Viljanen, and J. Salonen.** 2003. Semiquantitative detection by real-time PCR of *Aspergillus fumigatus* in bronchoalveolar lavage fluids and tissue biopsy specimens from patients with invasive aspergillosis. *J. Clin. Microbiol.* **41**:4304-4311.

**Renshaw, A. A.** 1994. The relative sensitivity of special stains and culture in open lung biopsies. *Am. J. Clin. Pathol.* **102**:736-740.

**Ribes, J. A., C. L. Vanover-Sams, and D. J. Baker.** 2000. Zygomycetes in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 236-301.

**Ruffini, E., S. Baldi, M. Rapellino, A. Cavallo, A. Parola, F. Robbiano, N. Cappello, and M. Mancuso.** 2001. Fungal infections in lung transplantation. Incidence, risk factors and prognostic significance. *Sarcoidosis Vasc. Diffuse Lung Dis.* **18**: 181-190.

**Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **74**(12): 5463-5467.

**Scully, C., O. P. de Almeida, and M. R. Sposto.** 1997. The deep mycoses in HIV infection. *Oral Dis.* **3**(Suppl. 1): 200-207.

**Siwek, G. T., K. J. Dodgson, M. de Magalhaes-Silverman, L. A. Bartelt, S. B. Kilborn, P. L. Hoth, D. J. Diekema, and M. A. Pfaller.** 2004. Invasive zygomycosis in hematopoietic stem cell transplant recipients receiving voriconazole prophylaxis. *Clin. Infect. Dis.* **39**:584-587.

**Soubani, A. O., G. Khanchandani, and H. P. Ahmed.** 2004. Clinical significance of lower respiratory tract *Aspergillus* culture in elderly hospitalized patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **23**:491-494.

**Subira, M., R. Martino, T. Franquet, C. Puzo, A. Altes, A. Sureda, S. Brunet, and J. Sierra.** 2002. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematologic malignancies: survival and prognostic factors. *Haematologica* **87**:528-534.

**Sugar, A. M.** 2000. Agents of mucormycosis and related species. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 5<sup>th</sup> edn. New York: Churchill Livingstone.

**Sun, Q. N., A. W. Fothergill, D. I. McCarthy, M. G. Rinaldi, and J. R. Graybill.** 2002. In vitro activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrobial Agents Chemother.* **46**:1581-1582.

**Tarrand, J.J., M. Lichterfeld, I. Warraich, M. Luna, X. Y. Han, G. S. May, and D. P. Kontoyiannis.** 2003. Diagnosis of invasive septate mold infections. A correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. *Am. J. Clin. Pathol.* **119**:854-858.

**Tedder, M., J. A. Spratt, M. P. Anstadt, S. S. Hegde, S. D. Tedder, and J. E. Lowe.** 1994. Pulmonary Mucormycosis: Results of medical and surgical therapy. *Ann. Thorac. Surg.* **57**:1044-1050.

**Tobón, A. M., M. Arango, D. Fernández, and A. Restrepo.** 2003. Mucormycosis (zygomycosis) in a heart-kidney transplant recipient: recovery after posaconazole therapy. *Clin. Infect. Dis.* **36**:1488-1491.

**Tsuchiya, D., and M. Taga.** 2001. Application of fibre-FISH (fluorescence in situ hybridisation) to filamentous fungi: visualization of the rRNA gene cluster of the ascomycete *Cochliobolus heterostrophus*. *Microbiology* **147**:1183-1187.

**Vainrub, B., A. Macareno, S. Mandel, and D. M. Musher.** 1988. Wound Zygomycosis (mucormycosis) in otherwise healthy adults. *Am. J. Med.* **84**:546-548.

**Venditti, M., M. Falcone, A. Micozzi, P. Carfagna, F. Taglietti, P. F. Serra, and P. Martino.** 2003. Staphylococcus aureus bacteremia in patients with hematologic malignancies: a retrospective case-control study. *Haematologica* **88**:923-930.

**Verweij, P. E., and D. W. Denning.** 1997. Diagnostic and therapeutic strategies for invasive aspergillosis. *Semin. in Resp. Crit. Care Med.* **18**:203-215.

**Von Eiff, M., M. Zuhlsdorf, N. Roos, M. Hesse, R. Schulten, and J. van de Loo.** 1995. Pulmonary fungal infections in patients with hematological malignancies – diagnostic approaches. *Ann. Hematol.* **70**:135-141.

**Wajszczuk, C. P., J. S. Dummer, M. Ho, T. E. Van Thiel, S. Iwatsuki, and B. Shaw.** 1985. Fungal infections in liver transplant recipients. *Transplantation* **40**: 347-353.

**Walsh, T. J., S. Shoham, R. Petraitiene, T. Sein, R. Schaufele, A. Kelaher, H. Murray, C. Mya-San, J. Bacher, and V. Petraitis.** 2004. Detection of galactomannan antigenemia in patients receiving Piperacillin-Tazobactam and correlations between in vitro, in vivo and clinical properties of the drug-antigen interaction. *J. Clin. Microbiol.* **42**:4744-4748

- Wald, A., W. Leisenring, J.-A. van Burik, and R. A. Bowden.** 1997. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *J. Infect. Dis.* **175**:1459-1466.
- Weig, M., M. Frosch, K. Tintelnot, A. Haas, U. Groß, B. Linsmeier, and J. Heesemann.** 2001. Use of recombinant mitogillin for improved serodiagnosis of *Aspergillus fumigatus*-associated disease. *J. Clin. Microbiol.* **39**:1721-1730.
- Weng, D. E., W. H. Wilson, R. Little, and T. J. Walsh.** 1998. Successful medical management of isolated renal zygomycosis: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* **26**:601-605.
- Westney, G. E., S. Kesten, A. de Hoyos, C. Chapparro, T. Winton, and J. R. Maurer.** 1996. *Aspergillus* infection in single and double lung transplant recipients. *Transplantation* **61**:915-919.
- Wu, Z., Y. Tsumura, G. Blomquist, and X.-R. Wang.** 2003. 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5389-5397.
- Wu, Z. Y., Q. Su, Y. L. Zhou, Y. M. Ni, and D. S. Ye.** 2004. The diagnosis and surgical treatment for 56 cases with pulmonary and pleural aspergillosis. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi.* **42**:614-616.
- Yankey, R., and A. A. Abraham.** 1983. Serological studies of a case of fatal craniofacial mucormycosis. *Mycopathologia* **82**:105-109.
- Yeo, S. F., and B. Wong.** 2002. Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:465-484.
- Zsikla, V., M. Baumann, and G. Cathomas.** 2004. Effect of buffered formalin on amplification of DNA from paraffin wax embedded small biopsies using real-time PCR. *J. Clin. Pathol.* **57**:654-656.

## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** PAS gefärbte Pilzelemente im Gewebeschnitt bei kulturell gesicherter Mucor-Mykose mit *Absidia corymbifera* (Originalvergrößerung 400fach)..... Seite 11
- Abbildung 2:** PAS gefärbte Hyphen im histologischen Präparat bei kulturell gesicherter Schimmelpilzinfektion mit *Aspergillus fumigatus* (Originalvergrößerung 1000fach)..... Seite 13
- Abbildung 3:** Wirkorte von Antimykotika im Stoffwechsel von Pilzen (nach Donnelly und De Pauw, 2004)..... Seite 14
- Abbildung 4:** Schematischer Ablauf einer Polymerase-Kettenreaktion..... Seite 18
- Abbildung 5:** Bindungsstellen der Primer bei einer semi-nested PCR ..... Seite 19
- Abbildung 6:** Alignment der 18S rDNA Sequenzen der Zygomyceten, die vom inneren Primerset ZM1 und ZM3 amplifiziert werden, nach einem Programm von Corpet, 1988 (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multialin/multialin.html>). Die komplementären Primerregionen sind mit schwarzen Balken gekennzeichnet. Schwarze Buchstaben markieren Nukleotidpositionen mit geringer oder fehlender Übereinstimmung; rote Buchstaben zeigen eine komplette Übereinstimmung aller Sequenzen an. Spezies und GenBank accession numbers von oben nach unten: *Absidia corymbifera* (AF113407), *Rhizomucor pusillus* (AF113434), *Cokeromyces recurvatus* (AF113416), *Saksenaea vasiformis* (AF113442), *Mucor hiemalis* (AF113428), *Rhizopus oryzae* (AF113440), *Cunninghamella bertholletiae* (AF113421), *Syncephalastrum racemosum* (X89437)..... Seite 30
- Abbildung 7:** PAS gefärbte Arteria cerebri media: makroskopisch ist eine das Lumen verengende Ablagerung erkennbar (Längs- und Querdurchmesser links oben), die mikroskopisch aus breiten, rechtwinklig abzweigenden Hyphen besteht (rechts oben: 100fache, links unten: 200- und rechts unten: 400fache Vergrößerung im Original)..... Seite 60
- Abbildung 8:** Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele mit Produkten der Zygomyceten- (oben) und Aspergillus nested PCR-Verfahren. Neben der mit Leerwert gekennzeichneten PCR-Kontrolle wurde die DNA folgender Laborpilzstämme verwendet (von Seite 65

links nach rechts): *Rhizomucor pusillus*, *Rhizopus oryzae*, *Absidia* spp., *Wangiella dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida tropicalis*, *Aspergillus fumigatus* (Marker: Fragmentlänge der Banden von oben nach unten: 1114, 900, 692, 501/489, 404, 320, 242, 190, 147, 124, 110 bp).....

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Aufteilung der Zygomyceten in Mucorales und Enteromophthorales (modifiziert nach Ribes et al., 2000).....	Seite 8
<b>Tabelle 2:</b>	Klinische Formen der Mucor-Mykose nach ihrer Häufigkeit (zusammengestellt nach Espinel-Ingroff et al., 1987, Chakrabarti et al., 1997, Sugar, 2000).....	Seite 9
<b>Tabelle 3:</b>	Inzidenz der invasiven Aspergillose in Bezug auf die Grunderkrankung der Patienten (modifiziert nach Denning, 1998).....	Seite 12
<b>Tabelle 4:</b>	Pipettierschema der Zygomyceten-PCR.....	Seite 31
<b>Tabelle 5:</b>	Temperaturprofil der Zygomyceten- und Aspergillus-PCR-Verfahren .....	Seite 32
<b>Tabelle 6:</b>	Pipettierschema der Zygomyceten nested PCR.....	Seite 32
<b>Tabelle 7:</b>	Pipettierschema der Aspergillus-PCR.....	Seite 35
<b>Tabelle 8:</b>	Pipettierschema der Aspergillus nested PCR.....	Seite 36
<b>Tabelle 9:</b>	Übersicht der Primer der Zygomyceten- und Aspergillus-PCR...	Seite 36
<b>Tabelle 10:</b>	Pipettierschema der $\beta$ -Globin-PCR.....	Seite 40
<b>Tabelle 11:</b>	Temperaturprofil der $\beta$ -Globin-PCR.....	Seite 40
<b>Tabelle 12:</b>	Pipettierschema der GAPDH-PCR.....	Seite 41
<b>Tabelle 13:</b>	Temperaturprofil der GAPDH-PCR.....	Seite 41
<b>Tabelle 14:</b>	Pipettierschema der GAPDH-nested PCR.....	Seite 42
<b>Tabelle 15:</b>	PCR-Primer zum Nachweis humaner DNA.....	Seite 43
<b>Tabelle 16:</b>	PCR-Ergebnisse der Paraffin eingebetteten Proben mit histologischer und/oder kultureller Diagnose einer Zygomycose (n=27) oder Aspergillose (n=18).....	Seite 54
<b>Tabelle 17:</b>	PCR-Ergebnisse der Paraffin eingebetteten Proben mit histologischer und/oder kultureller Diagnose einer Mischinfektion.....	Seite 55

**Tabelle 18:** Nachweis spezifischer DNA verschiedener Zygomycetenarten Seite 59  
in humanen Organen.....

## 9 Danksagung

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Tropenmedizin bedanke ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Knobloch.

Bei PD Dr. med. Bialek möchte ich mich sehr herzlich für die tolle Betreuung im Labor und auch während des Schreibens bedanken. Er fand immer Zeit für mich und so konnten alle kleineren und größeren Probleme schnell beseitigt werden und es ging rasch wieder weiter. Er verstand es durch Gespräche und Lob die Motivation und auch die Begeisterung für das Thema hoch zu halten. Seine Kritik war immer konstruktiv, was ich sehr zu schätzen wusste.

Für die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor sorgten Frau Dr. Zelck, Walter Deschle, Ulrike Müller, Marc, Caprice, Jan und Barbara. Danke.

Nicht zu vergessen Ines Heintzeler, ebenfalls Doktorandin bei Herrn Bialek. Wir bauten uns gegenseitig auf, wenn es mal nicht so lief und tauschten Erfahrungen aus (Wer weiß denn schon was Primerwolken sind?). Wenn man mal wieder einen ganzen Tag im Labor war und leider alles daneben ging, wusste man, wen man anrufen konnte. Danke!

Marc Hübner hat mir im Labor sehr viel beigebracht, dank ihm weiß ich beispielsweise wie man kloniert und unzählige andere Dinge! Er nahm sich immer die Zeit sich meine Probleme anzuhören und half mir wo er konnte.

Da ich mich leider mit Computern nicht auskenne, war ich doch sehr auf Vedran Čošković, Konstantin Konrad und Caprice Bien angewiesen. Ohne sie wäre ich oft verzweifelt und hätte auf so manche Abbildung verzichten müssen. Danke für die zahllosen Stunden!

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Ulrike Tichelmann, die meine Doktorarbeit zur Korrektur gelesen hat!

Für die vielen Massagen, wenn ich ganz verspannt war vor lauter Schreiben, und für das Verständnis möchte ich mich bei meinem Mann, Saša Konrad, sehr herzlich bedanken! Er hörte sich immer alles an, auch wenn es schwierig für ihn war alles nachzuvollziehen. Er half mir wo er konnte und tröstete mich, wenn der Computer wieder einmal abstürzte.

Großer Dank gebührt auch meinen Eltern, die mir in jeder Lebenslage halfen und immer für mich da waren. Sie ermöglichten mir das Studium und die vielen Auslandsaufenthalte.

## 10 Lebenslauf

### CURRICULUM VITAE

Franziska Konrad

#### Schulausbildung

Grundschule in Vöhringen	1985 - 1989
Realschule in Illertissen	1989 - 1995
Technisches Gymnasium in Sigmaringen	1995 - 1998
Förderpreis beim Schülerwettbewerb zur Förderung der politischen Bildung von der Landeszentrale für politische Bildung Baden-Württemberg	1998
Au Pair in Amerika	1998 - 1999

#### Studium

	1999 bis
Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen	voraussichtlich 2006
Physikum	2001
1. Staatsexamen	29.08.2002
Ein Urlaubssemester mit einem viermonatigen Westafrikaaufenthalt in Togo	04 – 08 2003
2. Staatsexamen	23.03.2005
3. Staatsexamen	09.05.2006